

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	新規抗がん剤キャリアおよび坑がん剤としての葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンの有用性評価
Author(s)	小野寺, 理沙子
Citation	
Issue date	2013-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/31281
Right	

目 次

緒言	1
第 1 章 新規抗がん剤キャリアとしての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリン (FA-M- β -CyD) の有用性評価	10
第 1 節 序	10
第 2 節 FA-M- β -CyD の調製と物性評価	12
第 1 項 トシル化メチル- β -シクロデキストリン (Ts-M- β -CyD) の調製	12
第 2 項 アミノ化メチル- β -シクロデキストリン (NH ₂ -M- β -CyD) の調製	13
第 3 項 FA-M- β -CyD の調製	16
第 4 項 粉末 X 線回折および示差熱分析 (DTA)	18
第 5 項 表面張力	20
第 3 節 溶血活性および形態変化に及ぼす β -CyDs の影響	21
第 1 項 溶血活性に及ぼす β -CyDs の影響	21
第 2 項 形態変化に及ぼす β -CyDs の影響	22
第 4 節 ドキソルビシン (DOX) と FA-M- β -CyD との安定度定数の算出	24
第 5 節 各種抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体の <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性	24
第 6 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性に及ぼす葉酸添加の 影響	29
第 7 節 FA-M- β -CyD 前処理および後処理の影響	30
第 8 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の細胞内取り込み	32
第 9 節 DOX の細胞からの排出に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	36
第 10 節 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす DOX/FA-M- β -CyD 複合体の影響	37
第 11 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の <i>in vivo</i> 抗腫瘍活性	40
第 12 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体投与後の血液生化学的パラメータ	42
第 13 節 考察	43
第 14 節 小括	46

第 2 章 メチル- β -シクロデキストリン (M- β -CyD) の抗腫瘍活性およびその誘導機構の

解明	48
第 1 節 序	48
第 2 節 M- β -CyD の <i>in vivo</i> 抗腫瘍活性	49
第 3 節 M- β -CyD 投与後の血液生化学的パラメータ	52
第 4 節 M- β -CyD の <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性	53
第 5 節 M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込み	54
第 6 節 DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす M- β -CyD の影響	56
第 7 節 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす M- β -CyD の影響	58
第 8 節 コレステロール漏出に及ぼす M- β -CyD の影響	59
第 9 節 M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすコレステロール添加の影響	60
第 10 節 考察	61
第 11 節 小括	64

第 3 章 新規腫瘍選択的抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリン

(FA-M- β -CyD) の有用性評価	66
第 1 節 序	66
第 2 節 FA-M- β -CyD の <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性	67
第 3 節 FA-M- β -CyD の <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性誘導機構	69
第 1 項 コレステロール漏出に及ぼす各種 β -CyDs の影響	69
第 2 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼす葉酸レセプター (FR) の影響	70
第 3 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシス阻害の影響	73
第 4 項 FA-M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込み	74
第 5 項 DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす FA-M- β -CyD の 影響	77
第 6 項 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	79
第 7 項 オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	80
第 8 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすオートファジー阻害剤添加の影響	81

第 9 項 FA-M- β -CyD 処理後のオートファゴソームとミトコンドリアとの共局在	82
第 4 節 FA-M- β -CyD の <i>in vivo</i> 抗腫瘍活性	86
第 5 節 FA-M- β -CyD 投与後の血液生化学的パラメータ	90
第 6 節 考察	91
第 7 節 小括	95
総括	97
謝辞	101
実験の部	102
参考文献	119

緒 言

がんは、わが国における死因第 1 位の疾患であり、2011 年の死亡者数は、35 万 7185 人、総死亡者数の 28.5% を占めている。早期発見率が向上し、一部のがんでは生存率の改善がみられるものの、進行がんでは未だ十分な治療法がなく、より有効な治療法・診断法の開発が望まれている。近年では、医薬品開発の急速な進歩により、これまで以上に治癒が期待される細胞毒性の強い抗がん剤が登場し、がん治療における化学療法の占める割合は増加傾向にある。しかし、ドキソルビシン (DOX)、パクリタキセル (PTX)、といった現状の抗がん剤の多くは、がん細胞の高い増殖効果に着目した細胞障害性を有する化合物が主流であるため、骨髄細胞などのように生成回転が活発で高い増殖能を持つ正常細胞に対して強い障害性を示すことが深刻な問題となっている。最近では、腫瘍の血管新生を選択的に阻害し、がん細胞の増殖を抑制する血管新生阻害剤イレッサTM やグリベックTM など、細胞障害性とは異なるメカニズムでがん細胞の増殖を抑制する分子標的治療薬が上市されている。^{1,2)} このように、がん治療の分野においては、治療効果の増大だけではなく、副作用の軽減、ひいては患者の Quality of life (QOL) の向上が重要な課題となることから、抗がん剤を標的部位に選択的かつ効率よくデリバリーさせる薬物送達システム (Drug delivery system : DDS) の構築が期待されている。

DDS とは、薬物の体内動態を制御し薬物治療の最適化を目指すものであり、生体内における薬物放出挙動の制御 (徐放化)、薬物の吸収促進 (吸収促進)、薬物の標的組織への特異的送達 (ターゲティング) などに分類される。なかでも、DDS 研究において最も重要なアプローチといわれるターゲティングは、生体の異物処理機構や解剖学的・生理学的特性などの本来生体が備えもつ機能を受動的に利用するパッシブターゲティングと、標的との明確な特異的相互作用を能動的に利用して標的指向化を図るアクティブターゲティングとに分類される。これらターゲティングを実現するために、薬物の溶解性や血中安定性を飛躍的に向上させるリポソーム^{3,4)} や高分子ミセル^{5,6)} などの微粒子キャリア、シクロデキストリン (CyD) 結合体、⁷⁾ 抗体に代表される高分子キャリアなどが開発されている。^{8,9)} 既に、臨床適応されているパッシブターゲティング製剤として、肝臓、脾臓などの細網内皮系 (Reticuloendothelial system : RES) を回避するポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム製剤である Doxil^{®10)} や

アルブミン結合 PTX 製剤である Abraxane[®] ^{11, 12)} が挙げられる。また、抗がん剤内包高分子ミセル製剤として世界で初めて膵臓がんを対象とした臨床試験が行われた DOX 内包高分子ミセル NK911 (Phase III) ¹³⁾ をはじめ、胃がん、乳がんを対象とした PTX 内包高分子ミセル NK105 (Phase II/III) ¹⁴⁾ など多くのパッシブターゲティング製剤が盛んに研究されている。しかし、このような微粒子製剤を用いることにより、薬物単独投与時とは異なる予期せぬ副作用が生じるケースもある。例えば、Doxil[®] は、DOX 単独投与時に比べて重篤な心毒性は観察されないものの、皮膚の圧迫部位への集積による手足症候群が副作用として報告されている。^{15, 16)} また、NK911 は Phase III 試験において十分な結果が得られていないのが現状である。そのため、パッシブターゲティング能は、がん標的治療において必要不可欠な概念ではあるが、それだけでは抗がん剤由来の副作用を完全に払拭することは困難であるため、標的細胞・組織へのデリバリー効率を向上させるアクティブターゲティング能を付与したキャリアの開発が必要である。キャリアに標的細胞・組織選択性を付与させる方法として、抗体、¹⁷⁾ 糖鎖、¹⁸⁾ 葉酸 (FA)、^{19, 20)} トランスフェリン、^{21, 22)} 上皮成長因子 ²³⁾ やインテグリン結合性を有する Arg-Gly-Asp-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly ペプチド ²⁴⁾ などのリガンド修飾が知られている。なかでも FA は 1) 安価である、2) 葉酸レセプター- α (Folate receptor- α : FR- α) は、各種上皮がん細胞で過剰発現し、正常細胞では発現が低い²⁵⁾ ため、FR- α 介在性 Clathrin-independent carrier/Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein-enriched early endosomal compartment (CLIC/GEEC) エンドサイトーシスにより FA をがん細胞選択的に取り込む、3) 抗原性がなく、反復投与が可能である、4) 分子量が比較的小さいことから、キャリアの細胞内動態に影響を与えにくい、などの利点からリガンド分子として汎用されている。

シクロデキストリン (CyD : Fig. 1) はデンプンに CyD 生成酵素を作用させて得られる環状のオリゴ糖であり、種々の薬物をその疎水空洞内に取り込み包接複合体を形成する単分子的ホスト分子に分類される。²⁶⁻²⁹⁾ CyDs の超分子的な包接特性は、食品、化粧品、臨床検査薬、膜学、高分子化学など多方面で利用されており、薬剤学・製剤学領域では、CyDs の機能性や生体適合性を利用して、複合体形成による医薬品の安定化、溶解性の調節、バイオアベイラビリティの向上、油状あるいは低融点物質の粉体化、揮散性の防止、苦味・悪臭および局所刺激性の軽減などへの応用が試みられ、国内外で実際製剤に使用されている。³⁰⁻³³⁾ しかしながら、天然 CyDs を薬物担体として応用するには限界があるため、機能性や生体適合性を高めた種々の CyDs 誘導体

が開発され、DDS の応用に関する基礎的研究が行われている。例えば、CyDs の水溶性を高めたメチル化体、ヒドロキシアルキル化体、スルフォブチル化体、分岐 CyDs などの親水性誘導体は難水溶性薬物の速放出用担体として有用であり、最近では包接対象が低分子から生理活性ペプチドやタンパク質性薬物などの高分子へ拡がり、その応用範囲も経口投与製剤から注射剤や経皮、経粘膜適用剤などの非経口投与製剤へ拡大している。³⁴⁻³⁸⁾ さらに服部らは、天然 β -CyD の 1 級水酸基にカプロン酸 2 分子をスペーサーとして FA を結合させた FA 修飾 β -CyD を調製し、FR- α 介在性がん細胞選択的 DDS キャリアとしての有用性を報告した。³⁹⁾ これらのことから、メチル- β -CyD (M- β -CyD) に FA を修飾することにより、FR- α を介したがん細胞選択性新規抗がん剤キャリアの構築が可能と考えられる。

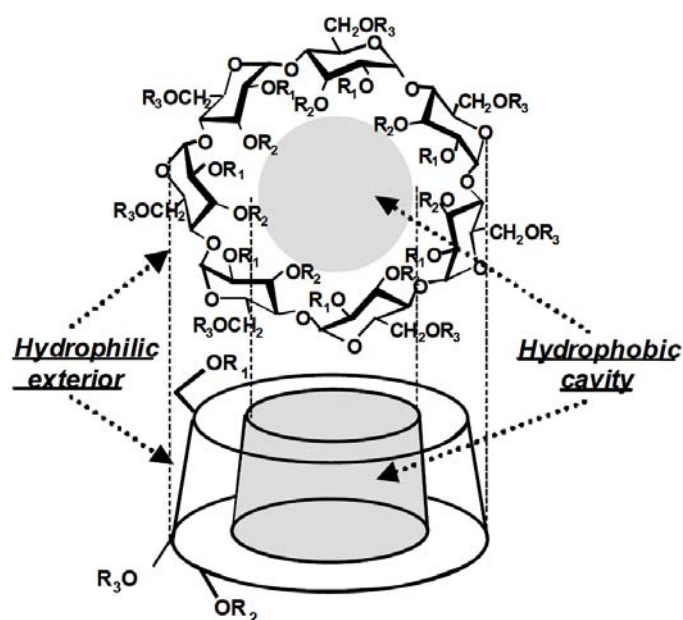


Fig. 1. Chemical Structure of β -CyDs

一方、細胞膜上には、リピッドラフトと呼ばれるコレステロールやスフィンゴ脂質が局在する脂質マイクロドメインの存在が知られ、GPI アンカー型タンパク質のほか、レセプターなどシグナル伝達に関与する種々のタンパク質が局在していることから、シグナル伝達において重要な足場として機能している。さらに近年、リピッドラフトには少なくとも、コレステロールリッチリピッドラフト (CLR) およびスフィンゴ脂質リッチリピッドラフト (SLR) の 2 種が存在し、^{40, 41)} FasL/Fas 系アポトーシスがリピッドラフトを介すること^{42, 43)}、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス誘導因子

Bad がラフトに局在することなどから、アポトーシスシグナルに関与することが報告されている。^{44,45)} 一方、CyDs は高濃度条件下、空洞サイズに応じて、赤血球膜などの生体膜から主な構成成分であるリン脂質やコレステロールなどの脂質類を熱力学的平衡に基づいて可溶化し、溶血、赤血球の形態変化、細胞障害性を惹起することが知られている。^{46,47)} また、当研究室ではラット肺胞マクロファージ由来 NR8383 細胞において、DM- β -CyD は CLR からコレステロールを漏出させることにより、PI3K-Akt 経路を抑制し、アポトーシスを誘導することを明らかにした。(Fig. 2)⁴⁸⁾ 一方、Grosse らは、担がんマウスにおいて M- β -CyD を腹腔内に単独投与 (800 mg/kg) すると DOX 単独投与系 (2 mg/kg) より高い抗腫瘍効果を示すことを報告した。⁴⁹⁾ これらのことから、M- β -CyD はリピッドラフトを介した抗腫瘍活性を有する新規抗がん剤として有用であると考えられる。しかしながら、M- β -CyD により誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かについての検討はこれまでほとんど行われていない。よって、M- β -CyD を抗がん剤に応用するためには、M- β -CyD による抗腫瘍活性誘導機構を明らかにすることは重要である。

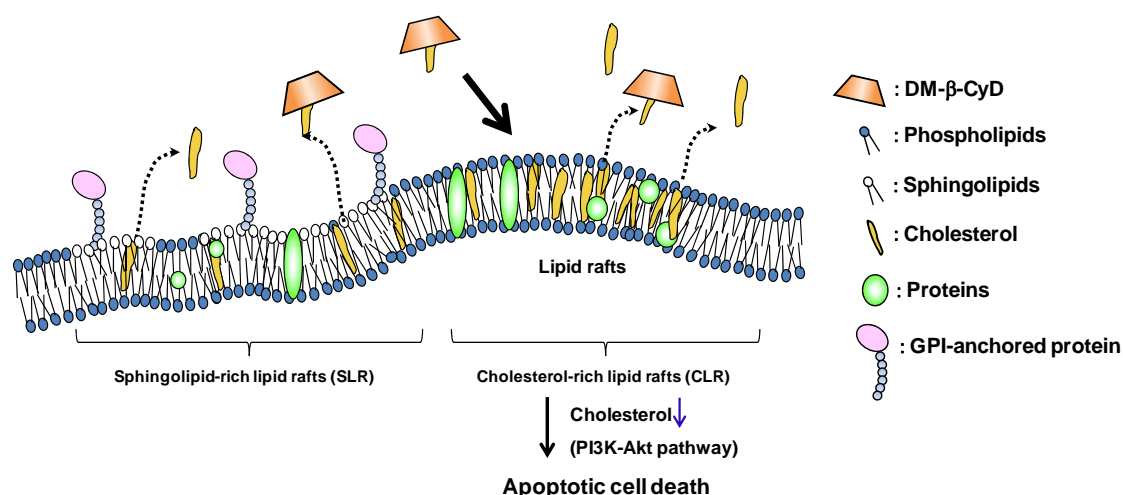


Fig. 2. Interaction of DM- β -CyD with Phospholipids or Cholesterol

一般に、抗がん剤により誘導される細胞死の多くはアポトーシス (Fig. 3) であるが、近年、アポトーシス以外の細胞死 (オートファジー、ネクローシス、セネセンス) が注目されている。なかでもオートファジーは、腫瘍細胞の発生・進展との関与が徐々に明らかとなっており、抗がん剤の新規ターゲットとして注目されている。⁵⁰⁾ オートファジーは、腫瘍発生段階では抑制的に働き、ある程度の成長・進展を遂げた段階では低栄養・低血流などのストレスに対する防御機構として腫瘍細胞保護的に働く

とされており、現時点では、1) マクロオートファジーの促進、または 2) マクロオートファジーの阻害を目標とした単独あるいは複数の化合物併用による抗腫瘍療法が各種細胞において検討され、一部では臨床試験が行われている。現在、臨床試験中のオートファジー誘導剤および抑制剤を Tables 1, 2 に示す。⁵¹⁾

Table 1. Autophagy Inducers for Cancer Treatment

Compound	Target	Tumor type/cancer cell types
Temsirolimus (CCI-779)	mTORC1 inhibitors	Renal cancer ^a , Mantle cell lymphoma
Everolimus (RAD-001)	mTORC1 inhibitors	Renal cancer ^a , Acute lymphoblastic leukemia
Rapamycin	mTORC1 inhibitors	Glioma malignant, Chronic myeloid leukemia (CML) ^a
Imatinib (Gleevec)	Tyrosine kinase inhibitors; KIT	Gastrointestinal stromal tumor ^a and CML ^a
Dasatinib (Sprycel)	BCR-Abl, PDGFR and EGFR	Glioma
Erlotinib (Tarceva)	BCR-Abl, PDGFR and EGFR	Non-small cell lung cancer ^a
Bortezomib	Proteasome inhibitors	Multiple myeloma ^a
NPI-0052	Proteasome inhibitors	Prostate cancer
Vorinostat (Zolinza)	HDAC inhibitors	Cutaneous T-cell lymphoma ^a
Butyrate, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	HDAC inhibitors	Multiple cancers, CML
Temozolomide (Temodar)	DNA alkylating agent	Glioblastoma, Metastatic melanoma ^a
GX15-070	Bcl2 inhibitor	Pancreatic carcinoma, Leukemia
Resveratrol	Antioxidant	Ovarian cancer

^aIndication for which approval has been obtained from the US Food and Drug Administration.

Table 2. Autophagy Inhibitors for Cancer Treatment

Compound	Target	Tumor type/cancer cell types
3-Methyladenine (3-MA)	Class III PI3 kinase inhibitor	Colorectal cancer
Chloroquine	Lysosomal pH	Malaria ^a , Breast cancer, Prostate cancer, Glioma Lymphoma
Hydroxychloroquine	Lysosomal pH	Malaria, Lupus, Rheumatoid arthritis ^a , Breast cancer
Monensin	Lysosomal pH	Glioma malignant
Bafilomycin A ₁	Vacuolar-ATPase	Glioma malignant, Breast cancer
Pepstatin A	Lysosomal protease (cathepsin inhibitor)	Cervical cancer

^aIndication for which approval has been obtained from the US Food and Drug Administration.

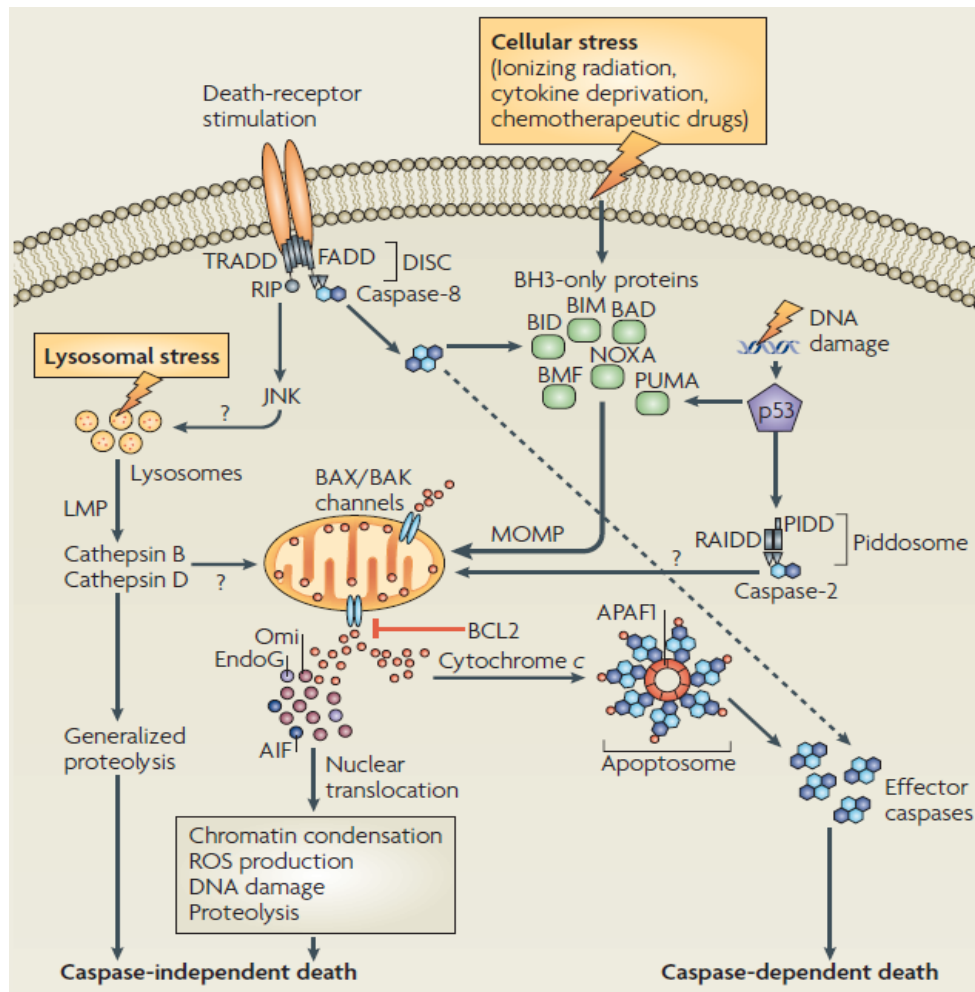


Fig. 3. Caspase-dependent and Caspase-independent Routes to Cell-death ⁵²⁾

オートファジーとは、自己タンパク質の分解経路の一つである。(Fig. 4) 現在、自己タンパク質分解経路は、ユビキチン/プロテアソーム系およびリソソーム/液胞系の2つに大別され、オートファジーはリソソーム/液胞系に分類される。ユビキチン/プロテアソーム系は、主に短寿命タンパク質の分解に働き、^{53,54)} リソソーム/液胞系は、主に細胞を構成する全タンパク質の99%を占める長寿命タンパク質の分解を担っている。分解されたタンパク質は、アミノ酸プールに入り再利用される。また、現在までに考えられているリソソームへの細胞質タンパク質の輸送機構は、1) マクロオートファジー、2) ミクロオートファジー、3) Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路、4) シャペロン介在性オートファジー、5) ペキソファジーの5つに分類される。⁵⁵⁾ そ

のうちマクロオートファジーは、まず細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれることで 2 重膜構造を形成し、次にエンドソームと融合しながら成熟、最後にリソソームと融合することでオートリソソームとなり内容物を分解する。⁵⁶⁾ オートファジーの分子機構の遺伝的解析は、1992 年に Takeshige らのグループによって酵母でオートファジーが誘導されることが報告されて以来、⁵⁷⁾ 急速に進展してきた。酵母細胞内の主要な構造体 (オルガネラ) は、ヒト細胞でも見られ進化上よく保存されている。酵母オートファジーは、さまざまな栄養源の枯渇によって誘導され、酵母のオートファジー成熟に関与する遺伝子 (*ATG*) の解析は数多く行われている。さらに、その関連因子は、ヒトを含めたいくつかの種においてよく保存されており、その発現量や局在性、機能などが解明されつつある。酵母 *ATG* の中でも *ATG8* の哺乳類オースログである LC3 は、オートファジーが誘導されるとオートファゴソームに結合することが明らかとなっており、⁵⁸⁾ *ATG8* を観察することでオートファジーの成熟を観察することが可能となっている。⁵⁹⁾

また近年、PI3K の 4 つのサブユニット (クラス IA, IB, II, III) のうち触媒サブユニットである Vps34 と制御サブユニットである Vps15/p150 とのヘテロ二量体として存在するクラス III PI3K は、オートファジーとの関連で注目されている。さらに Singh らは、ラット肝細胞由来 RALA255-10G 細胞において、1) 代表的なオートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) の添加あるいは Atg5 または Atg7 のノックダウン/ノックアウトにより、トリグリセリド (TG) および脂肪滴 (LD) の細胞内量が上昇すること、2) LD が LC3-II およびリソソームマーカーである LAMP1 と共局在すること、3) オートファゴソーム内に LD が観察されるなどの結果から、脂質代謝にもオートファジーが関与することを報告している。⁶⁰⁾ また、Yan らは、ヒト慢性骨髄性白血病細胞由来 K562 細胞において M- β -CyD が ERK/SPK1 の発現およびリン酸化を抑制することでオートファジーを誘導することを報告している。⁶¹⁾ これらのことから、M- β -CyD を抗がん剤として用いる場合、誘導される抗腫瘍活性誘導機構の解明にはアポトーシスのみならずオートファジーの関与も検討することが重要である。

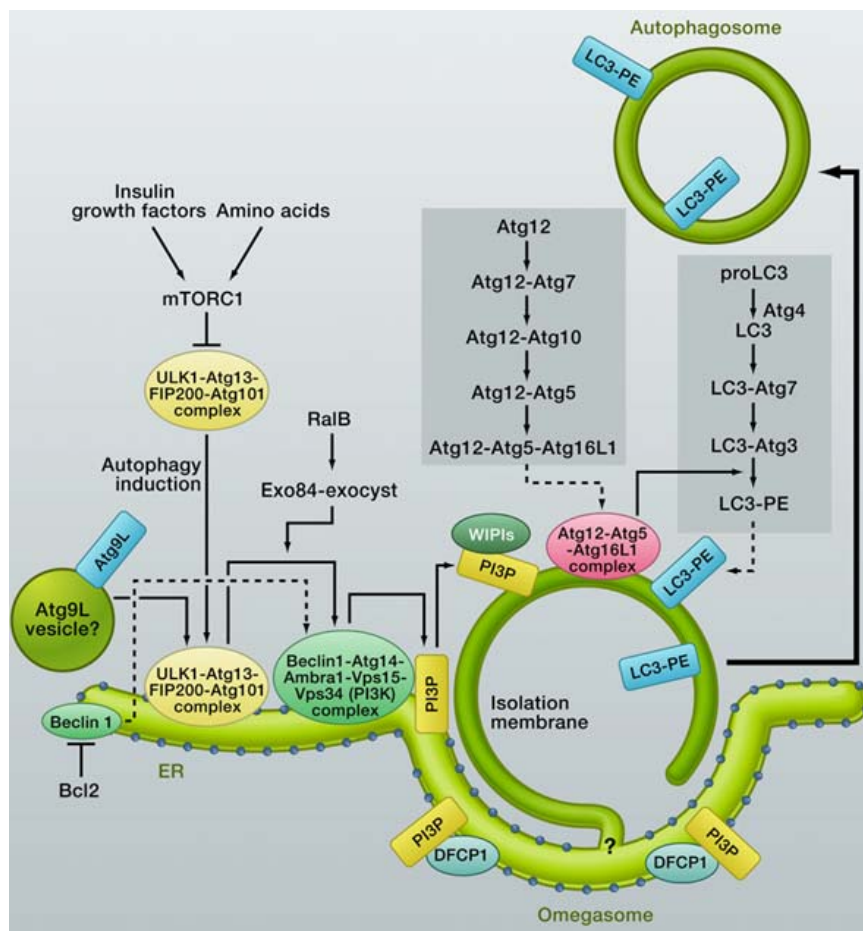


Fig. 4. Autophagosome Formation and Atg Proteins in Mammalian Cells⁵⁸⁾

そこで本研究では、M- β -CyD に FA を修飾した FA-M- β -CyD の腫瘍細胞選択的新規抗がん剤キャリアおよび抗がん剤としての有用性を明らかにするため、以下の検討を行った。第 1 章では、新規抗がん剤キャリアとしての FA-M- β -CyD の有用性評価を行うために、まず FA-M- β -CyD を調製し、調製の確認および物性評価を行った。次に、FR- α 高発現細胞 (FR- α (+)) であるヒト口腔がん細胞由来 KB 細胞および FR- α 低発現細胞 (FR- α (-)) であるヒト上皮がん細胞由来 A549 細胞を用い、各種抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性を検討した。次に、DOX の抗腫瘍活性に及ぼす FA-M- β -CyD の影響について検討した。また、安全性の観点から DOX/FA-M- β -CyD 複合体を担がんマウスに尾静脈内投与後、血液生化学的パラメータを測定した。さらに、担がんマウスを用いて DOX/FA-M- β -CyD 複合体を静脈内投与後の抗腫瘍活性を腫瘍体積、体重変化および生存率にて評価した。第 2 章では、FA 非修飾体である

M- β -CyD 自体の抗がん剤への応用を企図して、まず、*in vivo* における M- β -CyD の抗腫瘍活性を検討するため、担がんマウスを作成し、第 1 章と同様の検討を行った。また、安全性の観点から M- β -CyD を担がんマウスの尾静脈へ投与後の血液生化学的パラメータを測定した。次に、M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性について検討した。さらに、M- β -CyD の細胞死誘導機構の解明を目的に、*in vitro* 抗腫瘍活性に及ぼすコレステロール添加の影響およびアポトーシス誘導能について検討した。第 3 章では、腫瘍選択的抗がん剤としての FA-M- β -CyD 自体の有用性を検討するため、抗がん剤キャリアとして用いた場合より高濃度条件において、各種 FR- α (+) 細胞および FR- α (-) 細胞に対する抗腫瘍活性を検討した。次に、FA-M- β -CyD による抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図して、アポトーシス誘導能およびオートファジー誘導能について検討した。また、*in vivo* における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を検討するため、FR- α (+) 細胞であるマウス結腸がん細胞由来 Colon-26 細胞およびヒト胆管がん細胞由来 M213 細胞を皮下にそれぞれ同種移植および異種移植した担がんマウスを作成し、第 1 章と同様の検討を行い、これらの効果を DOX および M- β -CyD と比較した。さらに、安全性の観点から FA-M- β -CyD を担がんマウス尾静脈内へ投与後の血液生化学的パラメータを測定した。なお、本研究で用いた β -CyDs の構造を Table 3 に示す。

Table 3. Chemical Structures of β -CyDs Used in This Study

Compound	Abbreviation	R	DS ¹⁾
β -Cyclodextrin	β -CyD	OH	-
Methyl- β -cyclodextrin	M- β -CyD	H or CH ₃	12.2
2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin	DM- β -CyD	R ₂ , R ₆ = CH ₃ , R ₃ = H	14
Folate-appended methyl- β -cyclodextrin	FA-M- β -CyD	H or CH ₃ or FA	12.2 (1) ²⁾

1) The average degree of substitution of methly groups.

2) The average degree of substitution of folic acid.

第 1 章 新規抗がん剤キャリアとしての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリン (FA-M- β -CyD) の有用性評価

第 1 節 序

がん治療の最適化を目指す DDS 研究において、薬物を投与部位から標的の臓器や組織に安定かつ効率良く送達させるターゲティング技術は、最も重要なアプローチの一つである。例えば、抗がん剤 DOX は、広い抗腫瘍スペクトラムを有する薬物であるが、総投与量が 550 mg/m^2 (体表面積) を超えると、骨髄機能抑制や心毒性 (心筋障害・心不全・心電図異常など) などの副作用発現の頻度が増加する。⁶²⁾ これらの副作用を回避するため、DOX 封入 PEG 修飾リポソーム製剤として Doxil[®] が上市されている。しかしながら、PEG 修飾によってリポソームの血中滞留性は向上し、副作用は軽減されたものの、治療効果の改善には至らなかったという報告があり、⁶³⁾ 更なるデリバリー技術の改善が期待されている。

FR- α は、卵巣・肺・乳房・子宮内膜・腎臓・結腸など、各種上皮がん細胞で高発現しており、FA と極めて高い親和性 (解離定数: $K_d = \sim 1 \text{ nM}$) を有する。そのため、FR- α 高発現細胞への抗がん剤の選択的送達を企図して、キャリアへ FA を修飾した DDS 研究が盛んに行われている。例えば、Yanhua らは、PTX 内封 FA 修飾ヒアルロン酸ポリマーミセルが FR- α 高発現ヒト乳がん細胞由来 MCF-7 細胞選択的に取り込まれることを報告した。⁶⁴⁾ また、Scomparin らは、プルラン-PEG-DOX 結合体に FA を修飾することにより、FR- α 高発現 KB 細胞選択的な抗腫瘍活性の誘導を報告した。⁶⁵⁾ このように、抗がん剤デリバリーを行う際に、キャリアに FA を修飾することは、有用な手段となり得るものと考えられる。

一方、CyD は薬物の可溶化や安定化、バイオアベイラビリティの改善などに利用される製剤素材として知られている。なかでも、M- β -CyD は溶解性に優れ、天然 β -CyD と比較して優れた薬物包接能を有することから、クロラムフェニコールの可溶化剤として点眼剤に使用されている。また、欧州では脂溶性薬物 17 β -エストラジオールの可溶化剤および吸収促進剤として経鼻スプレーに応用されている。⁶⁶⁾ そこで本章では、M- β -CyD に FA を修飾した FA-M- β -CyD を新規に調製し、その腫瘍細胞選択的抗がん剤キャリアとしての有用性評価を行った。まず、FA-M- β -CyD を合成し、Fast Atom Bombardment (FAB) MS スペクトルおよび $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いて FA 置換度 (DSF) を算出後、粉末 X 線回折および示差熱分析 (DTA) により調製

確認を行った。次に、FR- α 高発現細胞 (FR- α (+)) である KB 細胞および FR- α 低発現細胞 (FR- α (-)) である A549 細胞を用いて各種抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性を検討した。また、DOX/FA-M- β -CyD 複合体による DOX の抗腫瘍活性増強機構の解明のため、DOX の細胞内取り込み量および細胞からの排出に及ぼす FA-M- β -CyD の影響、DOX によるカスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響について検討した。さらに、FR- α (+) 細胞である Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスに対する DOX/FA-M- β -CyD 複合体の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討した。

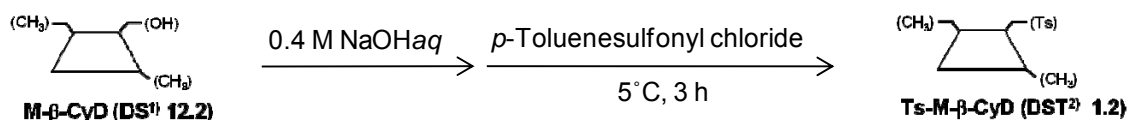
第 2 節 FA-M- β -CyD の調製と物性評価

第 1 項 トシル化メチル- β -シクロデキストリン (Ts-M- β -CyD) の調製

Scheme 1 に Ts-M- β -CyD の調製経路を示す。調製は高橋ら⁶⁷⁾の報告に準じて行った。まず、0.4 M 水酸化ナトリウム水溶液に M- β -CyD を溶解後、氷浴下、*p*-トルエンスルホニルクロライドを添加後、6 時間反応させることにより Ts-M- β -CyD を得た。調製の確認は TLC および FAB MS スペクトルにより行った。

Fig. 5 は、Ts-M- β -CyD の TLC (展開溶媒：酢酸エチル/2-プロパノール/25% アンモニア水/水 = 7:7:5:4、呈色試薬：アニスアルデヒド) および FAB MS スペクトル (Matrix: グリセロール、negative ion mode) を示す。なお、アニスアルデヒドはアルデヒド基がグルコースの水酸基と結合し、発色することから CyD の検出試薬として用いた。

調製したサンプルは、アニスアルデヒドに呈色した単一スポットを与えたことから CyD の存在が確認され、さらに UV 発色により M- β -CyD へのトシル基の導入が示唆された。FAB MS スペクトルにおいて、Ts-M- β -CyD は質量数 1488 (m/z) に親ピークを与え、この値から算出した Ts-M- β -CyD 中のトシル基の平均置換度 (DST) は 1.2 であった。(Fig. 6)



Scheme 1. Preparation Pathway of Ts-M- β -CyD

- 1) DS : degree of substitution of methyl group,
- 2) DST : degree of substitution of tosyl group.

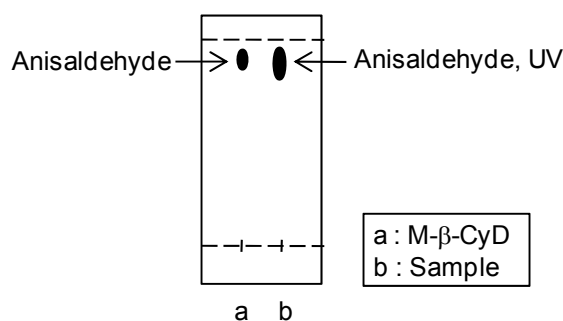


Fig. 5. Thin Layer Chromatography of Ts-M- β -CyD

Developing solvent was ethyl acetate/2-propanol/aqueous ammonia/water, 7/7/5/4 (v/v/v/v).

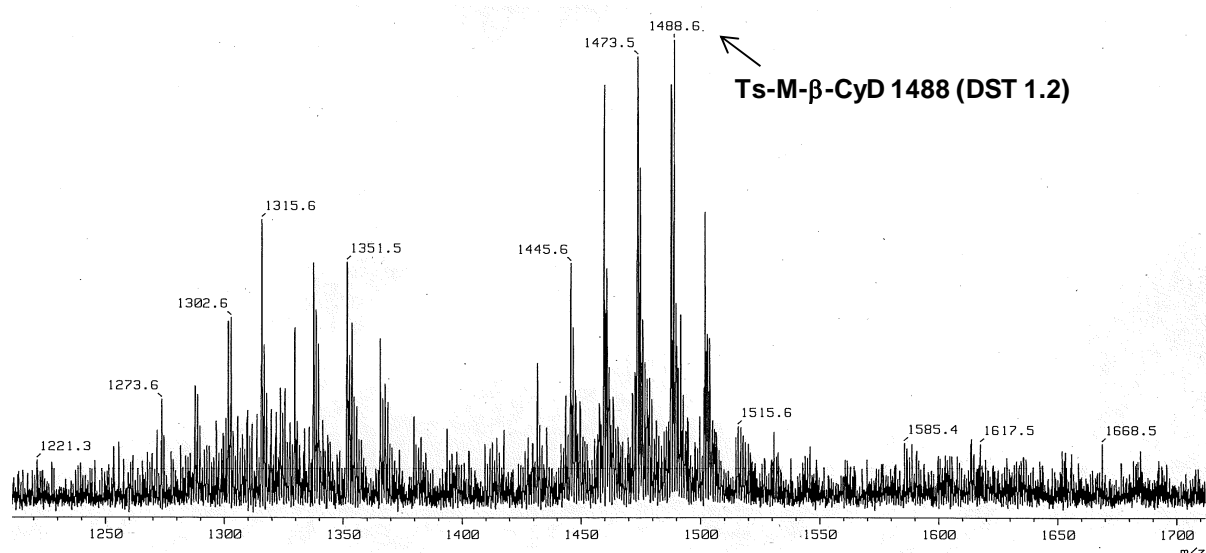
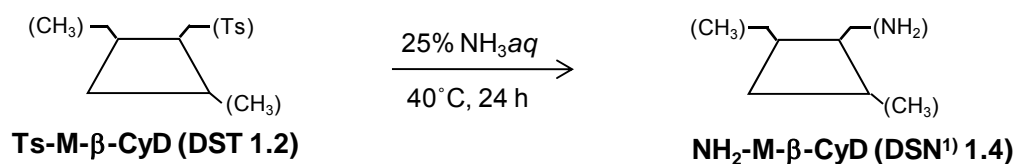


Fig. 6. FAB MS Spectrum of Ts-M-β-CyD

第 2 項 アミノ化メチル-β-シクロデキストリン (NH₂-M-β-CyD) の調製

次に、前節で合成した Ts-M-β-CyD (DST 1.2) を用いて、NH₂-M-β-CyD を調製した。(Scheme 2) Table 4 に NH₂-M-β-CyD の調製条件を示す。反応は TLC (展開溶媒 : 1-ブタノール/エタノール/水 = 5 : 4 : 3、呈色試薬 : ニンヒドリン、アニスアルデヒド) により追跡し、終点は UV とアニスアルデヒドの両方に呈色する Ts-M-β-CyD 由来のスポットが完全に消失した時点とした。まず、村上ら⁶⁸⁾の報告を参考に Ts-M-β-CyD 3 g を 25% アンモニア水 25 mL に溶解し、60°C にて 3 時間還流させたところ、M-β-CyD の界面活性作用により多くの気泡が発生し、十分に反応が進行しなかった。(Table 4; Run 1) そこで気泡の発生を抑えるために、室温にて反応させたところ、終点が 112 時間と長時間を要した。(Table 4; Run 2, Fig. 7A, B) また、40°C で反応させたところ、6 時間でプラトーに達し、未反応体の存在が確認された。(Table 4; Run 4, Fig. 7C, D) そこで、Ts-M-β-CyD 7 g に対し 25% アンモニア水を 120 mL に増加させたところ、24 時間で十分に反応が進行し、アニスアルデヒドおよびニンヒドリン (アミノ基検出試薬) に呈色するスポットが確認された。(Table 4; Run 4, Fig. 7E) これらの結果より、本反応条件により NH₂-M-β-CyD の調製が可能であることが示唆された。なお、TLC 板の上部に UV を吸収するスポットが確認されたが、これは Ts-M-β-CyD の調製時に用いた *p*-トルエンスルホンクロライドの未反応物に由来するものと考えられる。

Fig. 8 は、NH₂-M-β-CyD の FAB MS スペクトル (Matrix: グリセロール、negative ion mode) を示す。FAB MS スペクトルにおいて、NH₂-M-β-CyD は質量数 1314 (*m/z*) に親ピークを与え、この値から算出した NH₂-M-β-CyD 中のアミノ基の平均置換度 (DSN) は 1.4 であった。



Scheme 2. Preparation Pathway of NH₂-M-β-CyD

1) DSN : degree of substitution of amino group.

Table 4. Preparation Conditions of NH₂-M-β-CyD Used in This Study

Run	M-β-CyD (g)	NH ₃ aq (mL)	Temperature (°C)	Reaction time (h)	Observation
1	3	25	60	3	Reaction was not enough.
2	7	60	r.t.	112	Reaction time was too long.
3	7	60	40	9	Reaction was not enough.
4	7	120	40	24	Fully reacted.

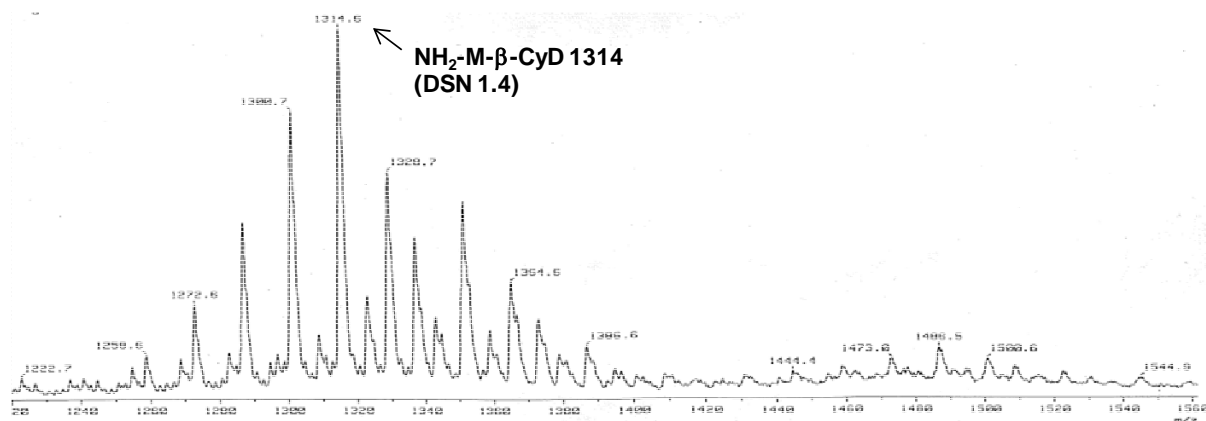
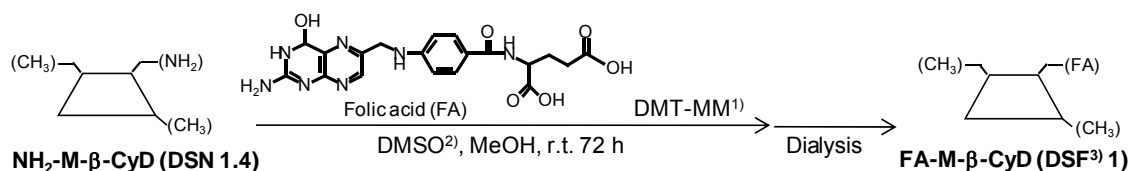


Fig. 8. FAB MS Spectrum of NH₂-M-β-CyD

第 3 項 FA-M-β-CyD の調製

次に、前節で合成した NH₂-M-β-CyD (DSN 1.4) を用いて FA-M-β-CyD を調製した。Scheme 3 に FA-M-β-CyD の調製経路を示す。反応は TLC (展開溶媒：1-ブタノール/エタノール/水/25% アンモニア水 = 5 : 4 : 3 : 5、呈色試薬：ヨウ素、アニスアルデヒド) により追跡した。(Fig. 9) まず、FA および NH₂-M-β-CyD をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後、縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) を含むエタノールを添加し、室温にて攪拌した。反応は 72 時間で十分に進行し、アミド結合を介した FA-M-β-CyD を得た。(Fig. 9B) 次に、得られた FA-M-β-CyD に大量のアセトンを添加し、未反応の FA を沈殿・除去後、0.1 M のアンモニア水溶液にて透析 (透析膜：MWCO = 1000) した。なお、透析により未反応の FA が残存しないことを TLC (展開溶媒：1-ブタノール/エタノール/水/25% アンモニア水 = 5 : 4 : 3 : 5、呈色試薬：ヨウ素、アニスアルデヒド) により確認した。

Figs. 10 および 11 は、それぞれ FA-M-β-CyD の FAB MS スペクトル (Matrix : グリセロール、negative ion mode) および ¹H-NMR スペクトル (溶媒 : D₂O) を示す。FAB MS スペクトルにおいて、FA-M-β-CyD は質量数 1738 (*m/z*) に親ピークを与え、この値から算出した FA の置換度 (DSF) は 1 であった。また、¹H-NMR スペクトルにおいて FA-M-β-CyD は 6.7、7.6 および 8.5 ppm 付近に FA のベンゼン環由来の新たなピークを与えた。FA のベンゼン環由来のプロトンと、M-β-CyD 中のグルコースのアノメリックプロトン (5 ppm 付近) の積分値より算出した FA-M-β-CyD の DSF は 1 であり、FAB MS スペクトルから算出した DSF と同様の結果が得られた。



Scheme 3. Preparation Pathway of FA-M-β-CyD

- 1) 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride,
- 2) Dimethyl sulfoxide,
- 3) DSF : degree of substitution of FA.

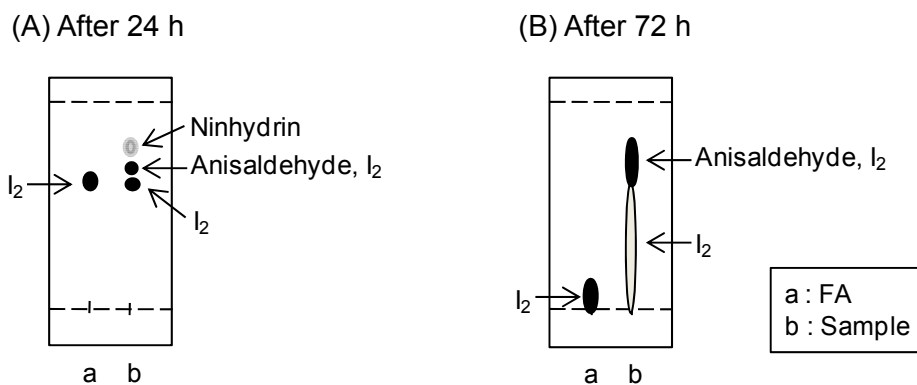


Fig. 9. Thin Layer Chromatography of FA-M-β-CyD

Developing solvent was 1-butanol/ethanol/water/aqueous ammonia, 5/4/3/5 (v/v/v/v) .

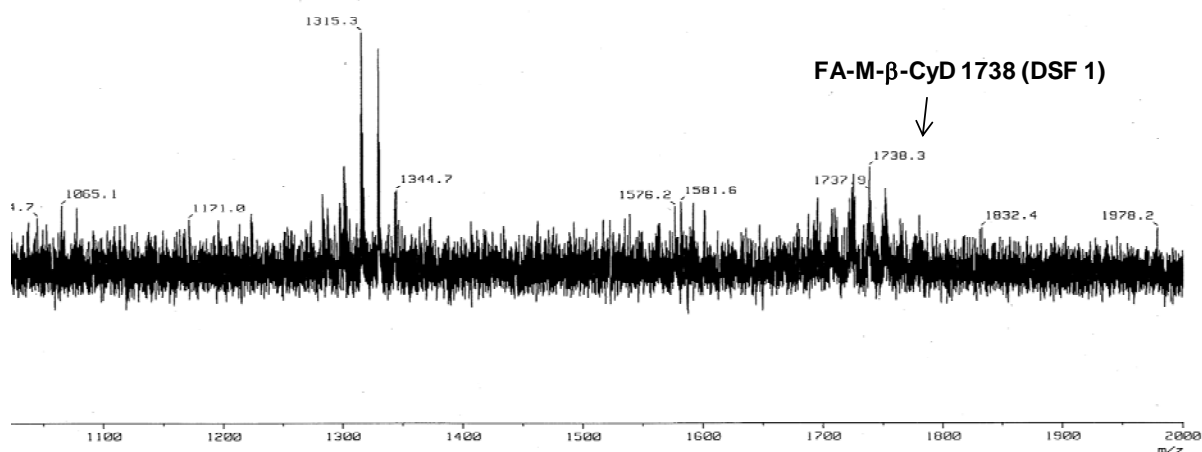


Fig. 10. FAB MS Spectrum of FA-M-β-CyD

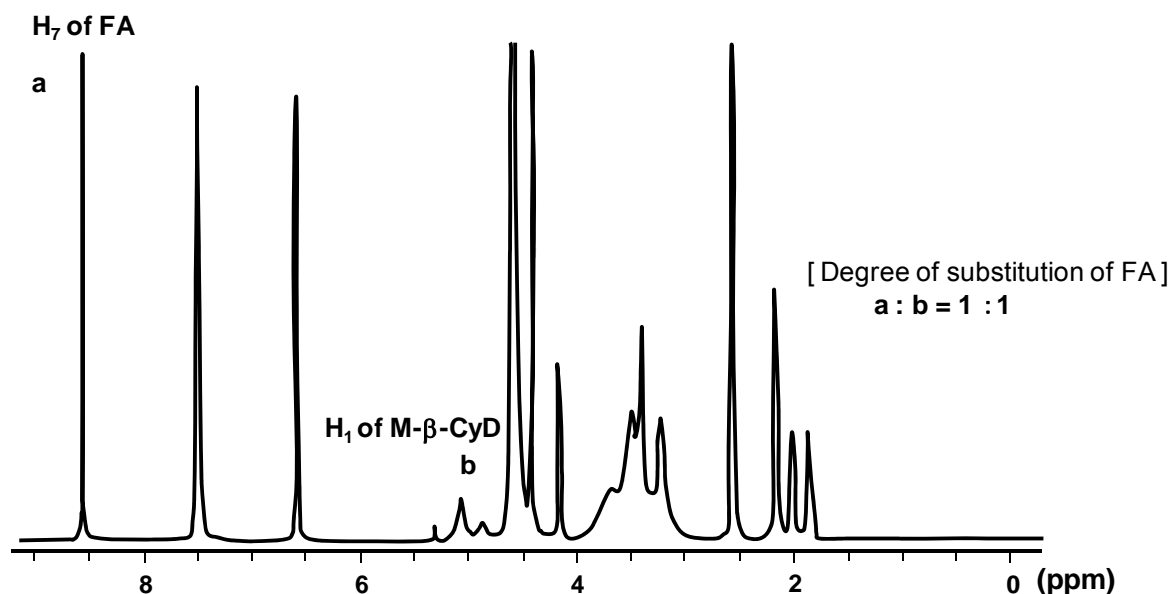


Fig. 11. ^1H -NMR Spectrum of FA-M- β -CyD in D_2O

第 4 項 粉末 X 線回折および示差熱分析 (DTA)

未知試料の同定、定量、物性評価などは、 ^1H -NMR および MS スペクトル、粉末 X 線回折、熱分析、赤外・紫外吸収スペクトル、密度、溶解速度など様々な物理化学的手法を用いて行われる。そこで本節では、FA-M- β -CyD の構造確認を粉末 X 線回折および DTA により行った。なお、FA-M- β -CyD は凍結乾燥後使用した。(Fig. 12)

粉末 X 線回折において、M- β -CyD の回折パターンは β -CyD および DM- β -CyD とは異なり、ハローを呈したことから、M- β -CyD は固体状態において非晶質であることが示された。M- β -CyD と FA との物理的混合物の回折パターンには、FA 由来のピークが認められたが、FA-M- β -CyD では FA 由来のピークが完全に消失し、ハローを呈した。このことから、FA-M- β -CyD は固体状態において M- β -CyD と同様に非晶質であり、未反応の FA の存在も少ないことが示唆された。(Fig. 13) また DTA 曲線において、FA-M- β -CyD は、 140°C 付近の FA 由来の吸熱ピークが消失し、M- β -CyD 類似のピークパターンを示した。(Fig. 14) これらの結果より、FA-M- β -CyD の調製が確認された。

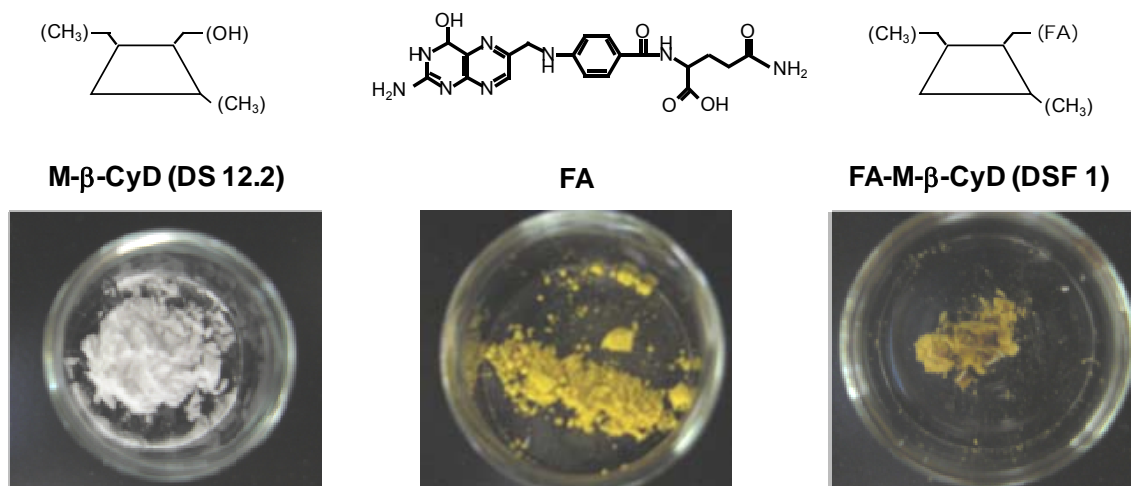


Fig. 12. Photographs of M-β-CyD, FA and FA-M-β-CyD

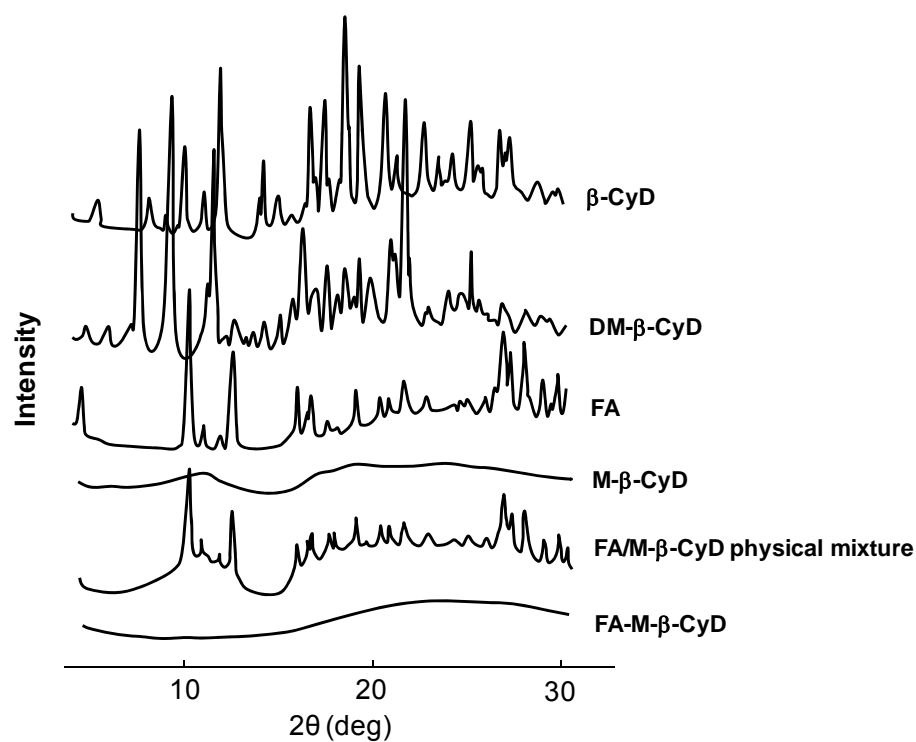


Fig. 13. Powder X-ray Diffraction Patterns of FA and β-CyDs

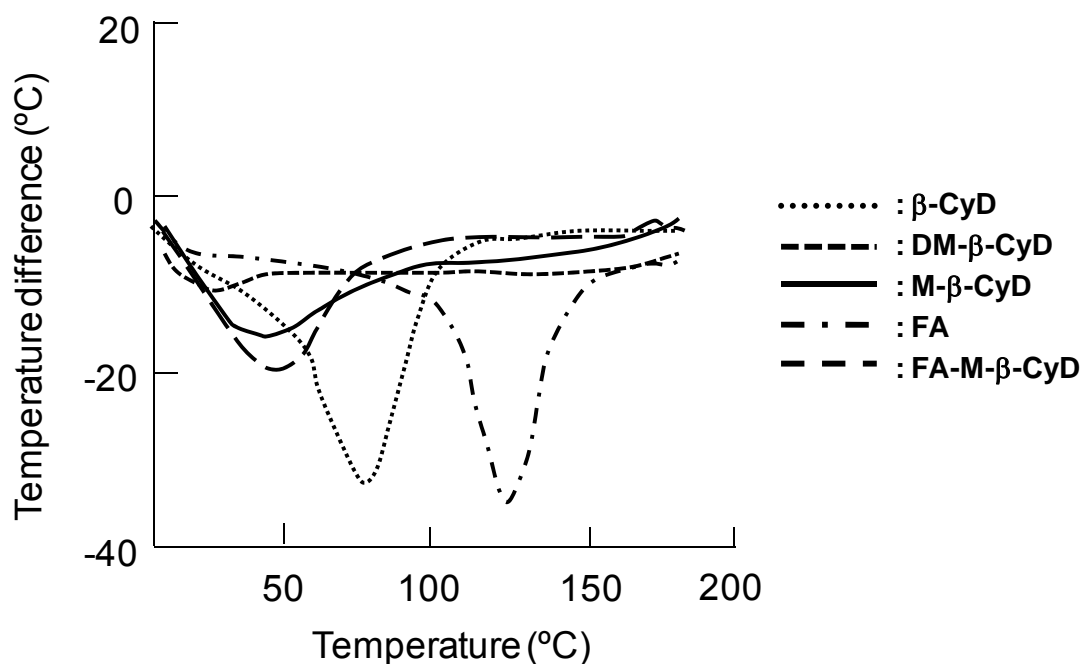


Fig. 14. DTA Thermograms of FA and β -CyDs

第 5 項 表面張力

M- β -CyD は分子内に水酸基 (親水基) とメチル基 (疎水基) を持つため、界面活性作用を有する。⁶⁹⁾ また、前述したように M- β -CyD や DM- β -CyD は優れた包接能に加えて、界面活性作用により細胞膜と強く相互作用する。そこで本節では、今回新規に調製した FA-M- β -CyD の界面活性作用の有無を調べるため、表面張力を測定した。

Fig. 15 は、各濃度における β -CyDs 水溶液の表面張力を示す。 β -CyD は界面非活性であり、表面張力は一定値を示した。一方、FA-M- β -CyD の表面張力は濃度の上昇に伴い低下したが、M- β -CyD や DM- β -CyD と比較して高値を示した。FA-M- β -CyD の表面張力が低下した理由として、FA-M- β -CyD 中の FA が M- β -CyD に分子間包接されることにより M- β -CyD 空洞内または周辺の疎水性が減少し、FA-M- β -CyD の気/液界面への正吸着が減少したためと推察される。

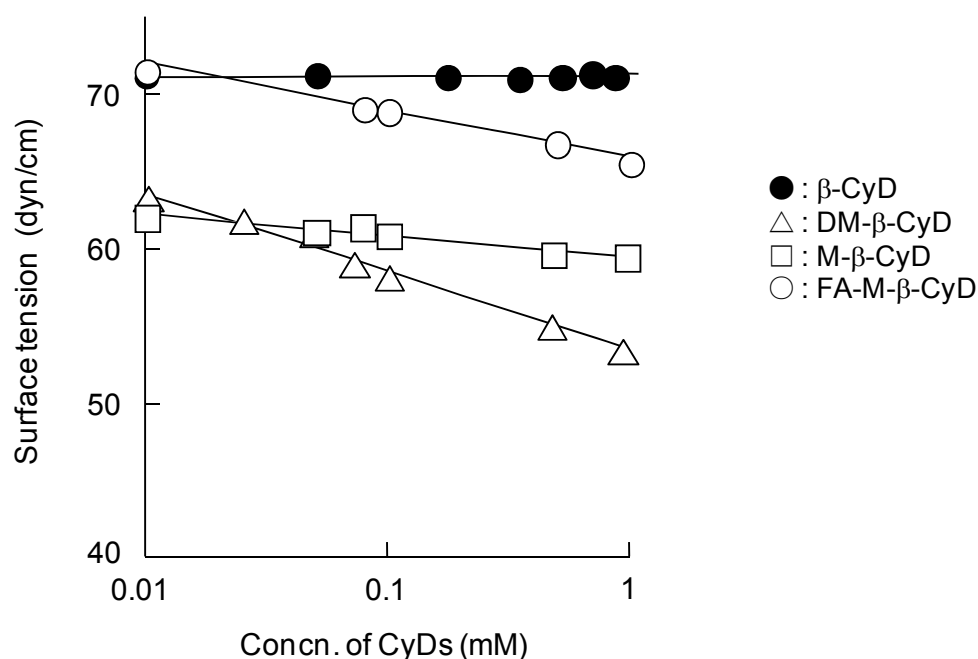


Fig. 15. Surface Tension of β -CyDs Solutions in Water at 25°C

第 3 節 溶血活性および形態変化に及ぼす β -CyDs の影響

第 1 項 溶血活性に及ぼす β -CyDs の影響

本項では、生体内投与時の局所刺激性を予測するため生体膜モデルとしてウサギ赤血球を用い、FA-M- β -CyD の溶血活性を測定した。調製した 5% ウサギ赤血球懸濁液を各濃度の β -CyDs 溶液に添加後、37°C で 30 分間処理し、上清を分取し、543 nm におけるヘモグロビンの吸光度から溶血率を算出した。得られた結果を Fig. 16 に示す。ここで、縦軸は蒸留水中における遊離ヘモグロビン量を 100% とした時の相対溶血率を示す。 β -CyD、DM- β -CyD、M- β -CyD および FA-M- β -CyD の溶血開始濃度は、それぞれ 3 mM、0.5 mM、1 mM および 8 mM であった。FA の導入により界面活性を示すにも関わらず、FA-M- β -CyD の溶血活性が低下した理由は、FA の立体障害による M- β -CyD の生体膜との相互作用の低下に起因するものと考えられる。これらの結果より、FA-M- β -CyD の溶血活性は、メチル化 CyDs だけではなく β -CyD よりも低いことから、FR- α 低発現細胞に対する障害活性は低いものと推定される。

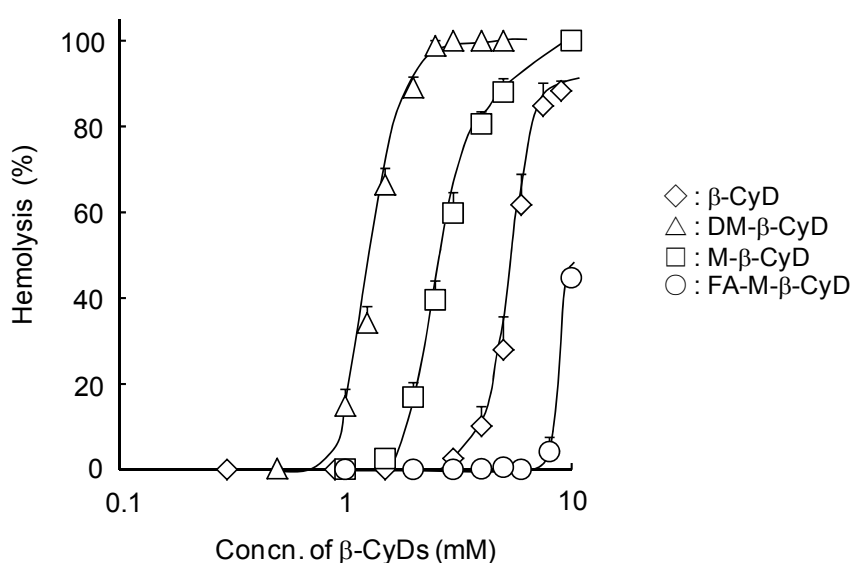


Fig. 16. Hemolytic Activity of β -CyDs on Rabbit Red Blood Cells (RRBC) in PBS (pH 7.4) at 37°C

Five percents of isolated RRBC suspensions with PBS were incubated with 1 mL of β -CyDs for 30 min at 37°C. The results were expressed as percent of total hemolysis, which was obtained when RRBC were incubated in water only. Each point represents the mean \pm S.E. of 3-7 experiments.

第 2 項 形態変化に及ぼす β -CyDs の影響

赤血球の形態変化には大きく分けて、外方突起型および内方陥没型の 2 種類が知られている。⁷⁰⁾ 当研究室では、ヒトまたはウサギ赤血球に高濃度の天然 CyDs を処理すると、リン脂質やコレステロールなどの膜成分が漏出され、内方陥没型の形態変化を示すことを報告した。^{46,71)} しかしながら、M- β -CyDs による赤血球形態変化の様式は異なるものと推測されるが、その詳細は不明である。

そこで、本項では M- β -CyDs によって惹起される赤血球の形態変化について検討した。実験は、5% 赤血球懸濁液を各濃度の CyDs 溶液にて 37°C で 30 分間処理し、グルタルアルデヒドを用いて固定化した後、イオンコーターを用いて金コーティングを施し、走査型電子顕微鏡にて観察した。

Fig. 17 に示すように、溶血開始濃度である 3 mM β -CyD 処理後の赤血球は、これまでの知見と同様に内方陥没型の形態変化を惹起したが、0.8 mM DM- β -CyD および 1 mM M- β -CyD を処理した赤血球は、外方突起型の形態変化を惹起した。また、30% 溶血率を示す 1.6 mM DM- β -CyD および 2 mM M- β -CyD 処理では、溶血開始濃度の

場合と比較して、形態変化の度合いがより大きくなることが示された。これらの結果より、M- β -CyDs は、 β -CyD の場合と異なり外方突起型の形態変化を惹起し、その形態変化は β -CyD よりも低濃度で開始されることが示された。

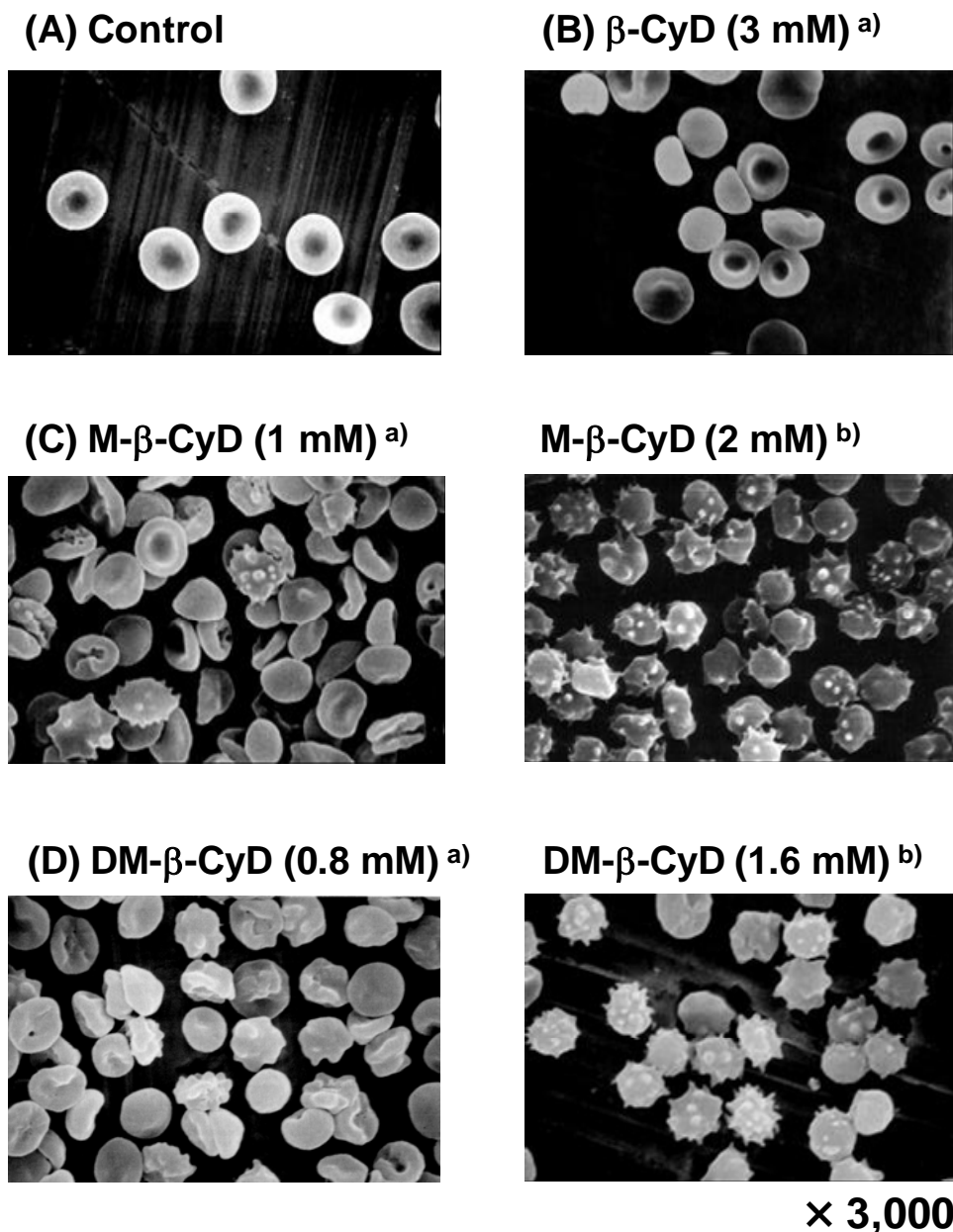


Fig. 17. Scanning Electron Microscopic Analysis of Morphological Change in RRBC Induced by β -CyDs

RRBC were treated with β -CyDs using the same method as used for hemolytic assay. After fixation of samples with 2% (v/v) glutaraldehyde, RRBC were resuspended with distilled water. The samples were dried, and then were sputtered with gold using an Ion Coater IB-3 followed by observation using a Hitachi S-510 SEM. a) The onset concentration of hemolysis. b) The concentrations which induce 30% hemolysis.

第 4 節 ドキソルビシン (DOX) と FA-M-β-CyD との安定度定数の算出

CyD を抗がん剤キャリアとして用いる場合、CyD と主薬または添加剤との競合包接、生体適用後の複合体の解離、体内動態などを制御する必要がある。⁶⁾ 一般に、薬物と CyD の安定度定数が $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ 以上であれば、静脈内投与後の薬物の体内動態を制御可能であると報告されていることから、⁷²⁾ CyD と薬物との安定度定数を算出することは極めて重要である。そこで、本節では、DOX と M-β-CyDs との安定度定数を蛍光スペクトル法により算出した。スペクトル法を用いた溶液中での複合体形成の解析法としては、Scott 式がよく知られている。⁷³⁾ Table 5 は、リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中における DOX と M-β-CyDs との安定度定数 (K_c) を Scott 式より求めた結果を示す。なお、ここで pH 7.8 を用いた理由は、生理的 pH において FA-M-β-CyD の溶解度が低く、相互作用の検討が可能な中性に付い pH を選んだためである。M-β-CyD および FA-M-β-CyD は DOX とモル比 1 : 1 で複合体を形成すると仮定した場合、それぞれ $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と著しく高い安定度定数を示した。なお、M-β-CyD および FA-M-β-CyD と DOX との包接複合体の包接様式は、溶解度等の問題のため明らかではなく、今後の課題としたい。

Table 5. Stability Constants (K_c) of DOX/M-β-CyDs Complexes in Phosphate Buffer (pH 7.8)

System	$K_c (\text{M}^{-1})$
DOX/M-β-CyD complex	$3.1 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^4$
DOX/FA-M-β-CyD complex	$3.0 \times 10^5 \pm 4.1 \times 10^4$

The concentration of DOX was 12.5 μM. The concentration of M-β-CyDs were 6.25-50 μM. The stability constant was calculated by Scott's equation. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments.

第 5 節 各種抗がん剤/FA-M-β-CyD 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性

前節の検討により、FA-M-β-CyD は DOX と複合体を形成することが示唆された。そこで本節では、DOX に加え、PTX および 5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍活性に及ぼす FA-M-β-CyD の影響を検討した。

PTX は、タキサン類に分類される有糸分裂阻害薬であり、乳がん、卵巣がんなど

の固形がんに適応されている。しかし、PTX は P-糖タンパク質 (P-gp) の基質となることから多剤耐性を誘導しやすい。さらに、PTX は極めて脂溶性が高く水に不溶であるため、注射液には溶媒としてポリオキシエチレンヒマシ油とアルコールが用いられている。しかし、この溶媒が肥満細胞を刺激し、ヒスタミンを遊離させるため、静脈内投与後に気管支れん縮、低血圧、蕁麻疹等の過敏反応といった重篤な副作用を示すことが懸念されている。また、5-FU はピリミジン代謝拮抗薬であり、胃がん、肝がん、大腸がんなどの各種腫瘍に広い抗がんスペクトルを有する。特に、5-FU およびその誘導体は大腸がんの第一選択薬となっている。しかしながら、副作用として激しい下痢や出血性腸炎などの消化器症状、それに伴う脱水症状などが知られている。これらのことから、治療効果の増大および副作用の軽減を目的とした DDS キャリアの開発が強く望まれている。

本節では、各種抗がん剤と FA-M- β -CyD との複合体を KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。なお、FA-M- β -CyD 中のメチル基の役割を明らかにするため、FA 修飾 β -CyD (FA- β -CyD) を調製し、各種抗がん剤の抗腫瘍活性に及ぼす影響を FA-M- β -CyD と比較した。

Fig. 18 は、各種 DOX/ β -CyDs 複合体を KB 細胞 (FR- α (+)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を示す。DOX と天然 β -CyD に FA を修飾した FA- β -CyD との複合体である DOX/FA- β -CyD 複合体および DOX/M- β -CyD 複合体は DOX の抗腫瘍活性を増強させなかったのに対して、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、DOX 単独と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。一方、A549 細胞 (FR- α (-)) において、DOX/M- β -CyDs 複合体は DOX の抗腫瘍活性を増加させなかったのに対し、DOX/FA- β -CyD 複合体は DOX の抗腫瘍活性を有意に増強した。(Fig. 19)

KB 細胞 (FR- α (+)) において、PTX/FA- β -CyD および PTX/M- β -CyD 複合体は PTX の抗腫瘍活性を増強させなかったのに対して、PTX/FA-M- β -CyD 複合体は、PTX 単独と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。(Fig. 20)

さらに、KB 細胞に 5-FU と各種 β -CyDs との複合体を処理しても、5-FU の抗腫瘍活性は増強されないことが示された。(Fig. 21)

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的に DOX および PTX の抗腫瘍活性を増強するが、5-FU の抗腫瘍効果は増強しないことが示された。また、FA- β -CyD は FR- α 高発現細胞において DOX および PTX の抗腫瘍活性を増強さ

せなかったことから、FA-M- β -CyD による抗腫瘍活性増強効果には、メチル基導入による薬物と CyD との安定な複合体形成が必要であることが示唆された。なお、以降の検討では、臨床で汎用されている DOX を用いて、DOX/FA-M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性の詳細を調べた。

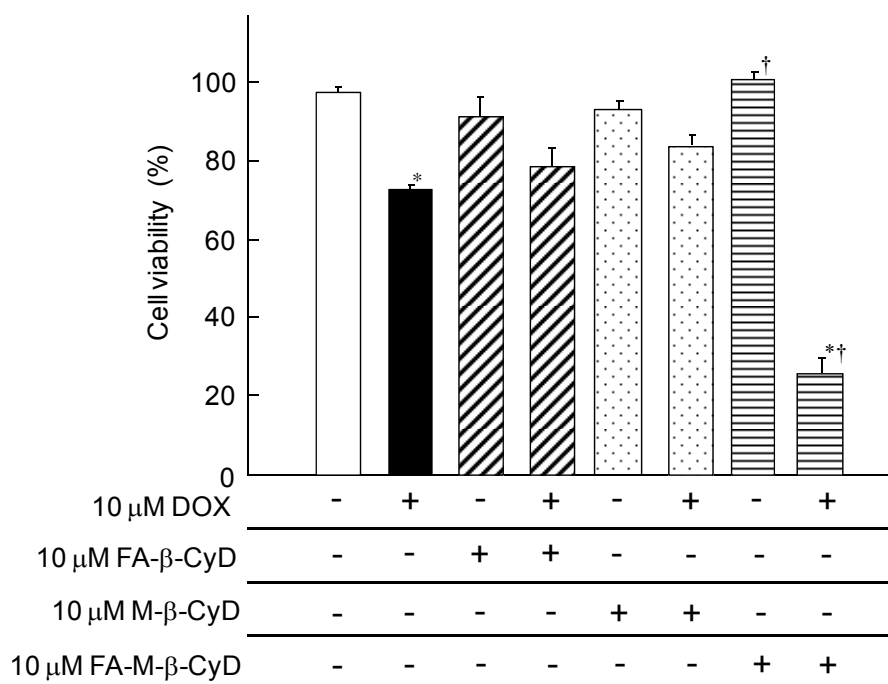


Fig. 18. Antitumor Activity of DOX/β-CyDs Complexes in KB Cells (FR-α (+))

DOX/β-CyDs complexes were treated for 24 h. The molar ratio of DOX/β-CyDs was 1:1. The concentrations of DOX and β-CyDs were 10 μM. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments.

* $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with DOX alone.

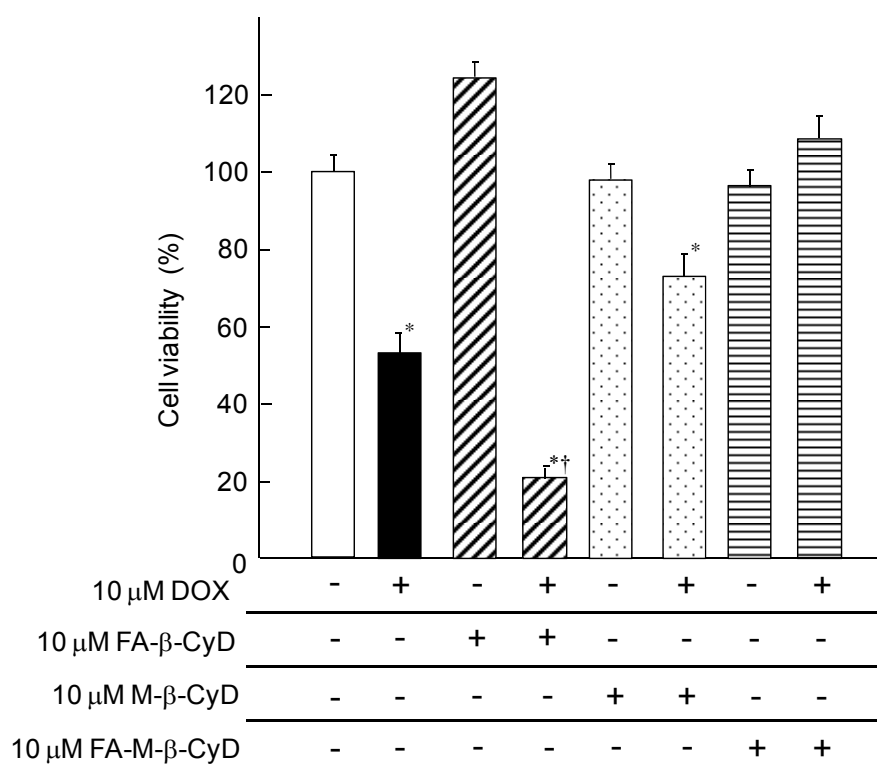


Fig. 19. Antitumor Activity of DOX/β-CyDs Complexes in A549 Cells (FR-α (-))

DOX/β-CyDs complexes were treated for 24 h. The molar ratio of DOX/β-CyDs was 1:1. The concentrations of DOX and β-CyDs were 10 μM. Each value represents the mean ± S.E. of 6-9 experiments.

* $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with DOX alone.

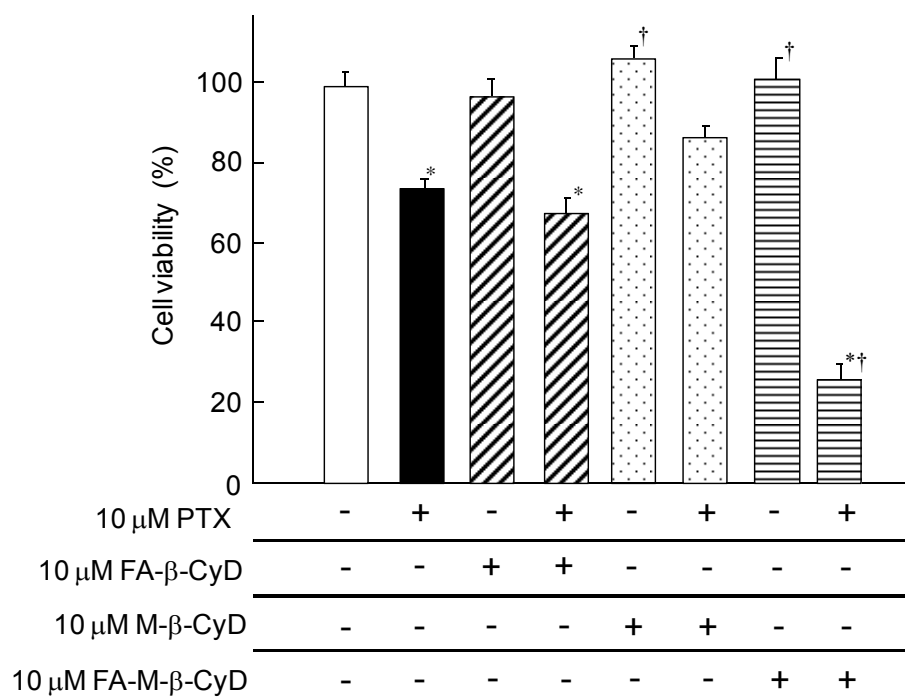


Fig. 20. Antitumor Activity of PTX/β-CyDs Complexes in KB Cells (FR-α (+))

PTX/β-CyDs complexes were treated for 2 h. After washing with RPMI-1640 medium (FA-free), KB cells were further incubated with RPMI-1640 (FA-free) for 24 h. The molar ratio of PTX/β-CyDs was 1:1. The concentrations of PTX and β-CyDs were 10 μM. Each value represents the mean ± S.E. of 3-6 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with PTX alone.

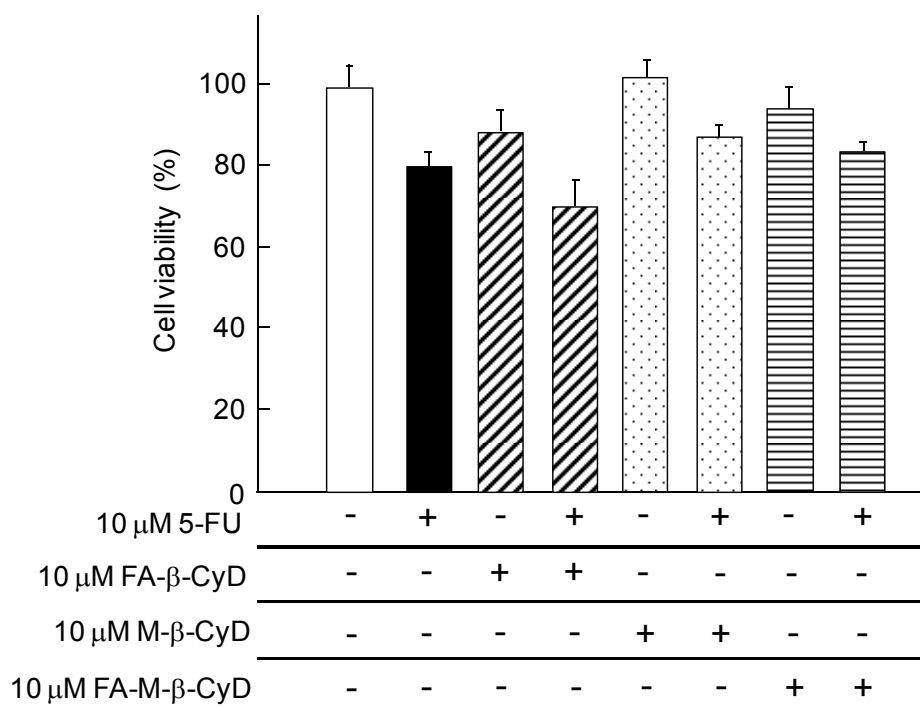


Fig. 21. Antitumor Activity of 5-FU/β-CyDs Complexes in KB Cells (FR-α (+))

5-FU/β-CyDs complexes were treated for 24 h. The molar ratio of 5-FU/β-CyDs was 1:1. The concentrations of 5-FU and β-CyDs were 10 μM. Each value represents the mean ± S.E. of 6-12 experiments.

第 6 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性に及ぼす葉酸添加の影響

前節では、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は FR- α 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を上昇させることが示唆された。そこで本節では、DOX/FA-M- β -CyD 複合体による DOX の抗腫瘍活性増強作用が、FR- α を介したものであるか否かを FR 競合阻害剤を用いて検討した。Fig. 22 は、FR 競合阻害剤 FA (1 mM) 存在下、DOX/ β -CyDs 複合体を 24 時間適用後の抗腫瘍活性を示す。DOX/FA- β -CyD および DOX/M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性は、FA 添加の影響を受けなかった。一方、FA 存在下、DOX/FA-M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性は、FA 非添加系と比較して、有意に低下した。これらの結果より、DOX/FA-M- β -CyD 複合体による DOX の抗腫瘍活性増強作用は、FR- α を介することが示唆された。

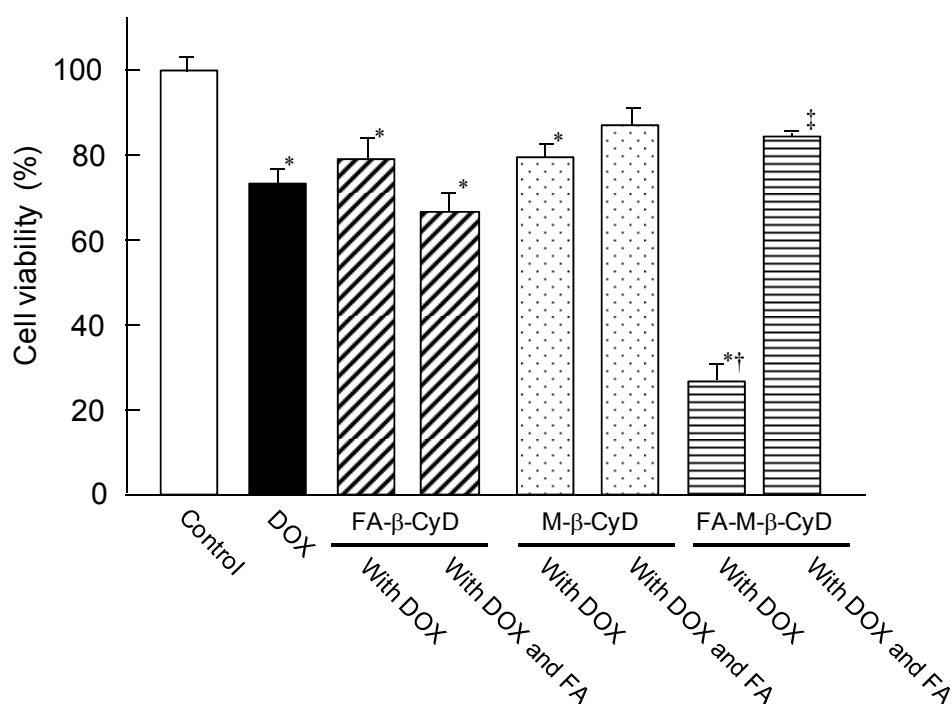


Fig. 22. Effect of FA on Antitumor Activity of DOX/ β -CyDs Complexes in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 24 h

KB cells (2×10^4 cells/well) were incubated for 1 h with FA (1 mM) at 37°C. KB cells were washed with medium (FA-free), and then incubated for 24 h with 150 μ L of medium containing DOX (10 μ M) and/or β -CyDs, and 1 mM FA at 37°C. After washing twice with PBS to remove samples, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 6-15 experiments. * p < 0.05, compared with control. † p < 0.05, compared with DOX. ‡ p < 0.05, compared with DOX/FA-M- β -CyD complex.

第 7 節 FA-M- β -CyD 前処理および後処理の影響

前節までの結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞上の FR- α を介して DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。DOX の抗腫瘍活性増強機構として、1) FA-M- β -CyD が細胞形質膜と相互作用し、DOX の細胞膜透過性を上昇させたこと、2) FA-M- β -CyD との包接複合体形成により、FR- α を介した DOX の細胞内取り込み量が増加したことなどが考えられる。そこで本節では、DOX の抗腫瘍活性に及ぼす FA-M- β -CyD 前処理および後処理の影響を検討した。

Fig. 23 は、KB 細胞に各種 β -CyDs を 2 時間適用後、さらに DOX を処理しその 24 時間後の抗腫瘍活性を示す。その結果、FA- β -CyD、M- β -CyD および FA-M- β -CyD を前処理しても、DOX の抗腫瘍活性は増強されないことが示唆された。一方、Fig. 24 は、KB 細胞に DOX を 2 時間適用後、さらに各種 β -CyDs を 24 時間処理後の抗腫瘍活性を示す。Fig. 23 と同様に、FA- β -CyD、M- β -CyD および FA-M- β -CyD を後処理しても、DOX の抗腫瘍活性は増大されなかった。

これらの結果より、FA-M- β -CyD による DOX の抗腫瘍活性の増強には、両者の複合体形成の重要性が示唆された。

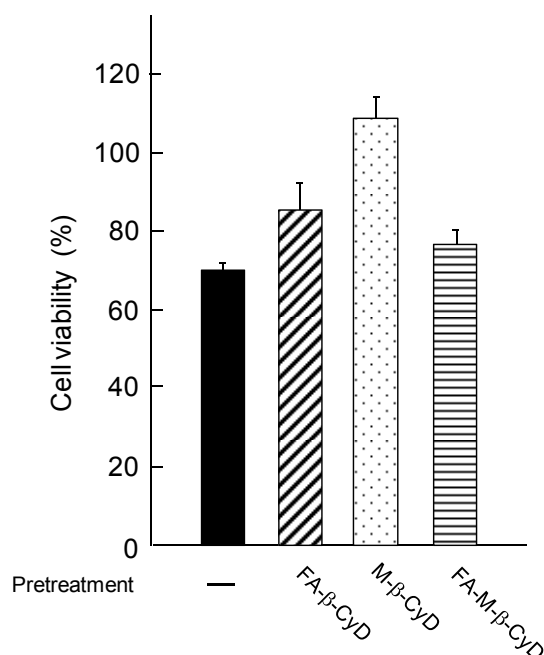


Fig. 23. Effects of Pretreatment of β -CyDs on Antitumor Activity of DOX in KB Cells (FR- α (+))

β -CyDs (10 μ M) were pretreated for 2 h in KB cells. After washing with RPMI-1640 medium (FA-free), DOX (10 μ M) was treated for 24 h. After washing twice with PBS to remove samples, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-6 experiments.

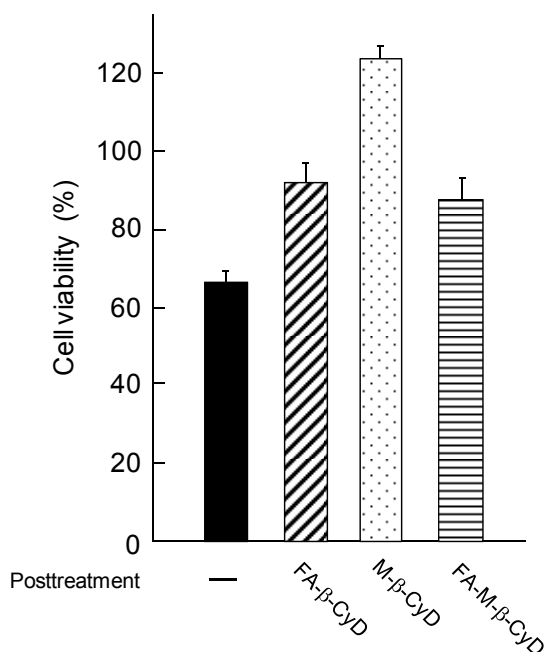


Fig. 24. Effects of Posttreatment of β -CyDs on Antitumor Activity of DOX in KB Cells (FR- α (+))

DOX (10 μ M) was pretreated for 2 h in KB cells. After washing with RPMI-1640 medium (FA-free), β -CyDs (10 μ M) were treated for 24 h. After washing twice with PBS to remove samples, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 6-9 experiments.

第 8 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の細胞内取り込み

前節において、FA-M- β -CyD による DOX の抗腫瘍活性増強には、両者が複合体を形成することの重要性が推定された。そこで本節では、KB 細胞および A549 細胞を用いて DOX の細胞内取り込み量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。実験は、DOX/ β -CyDs 複合体を KB 細胞および A549 細胞へ添加した後、DOX の細胞内取り込みを蛍光顕微鏡にて観察し、BZ-II 解析アプリケーションを用いて定量した。

DOX 単独およびいずれの DOX/ β -CyDs 複合体系においても、KB 細胞内に DOX 由来の蛍光が観察されたが、DOX/FA-M- β -CyD 複合体系の蛍光強度が最も強く (Fig. 25A)、細胞内取り込み量の結果 (Fig. 25B) とよく符合した。さらに Fig. 26 に示すように、DOX 単独、DOX/FA- β -CyD および DOX/M- β -CyD 複合体系では、FA を添加しても KB 細胞内の DOX の蛍光強度はあまり変化しなかったが、DOX/FA-M- β -CyD 複合体系では FA 添加によりその蛍光強度が著しく低下した。一方、A549 細胞では DOX/ β -CyDs 複合体のいずれにおいても、DOX の蛍光強度は低下した。(Fig. 27)

これらの結果より、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、FR- α を介して DOX の細胞内取り込みを上昇させることが示された。

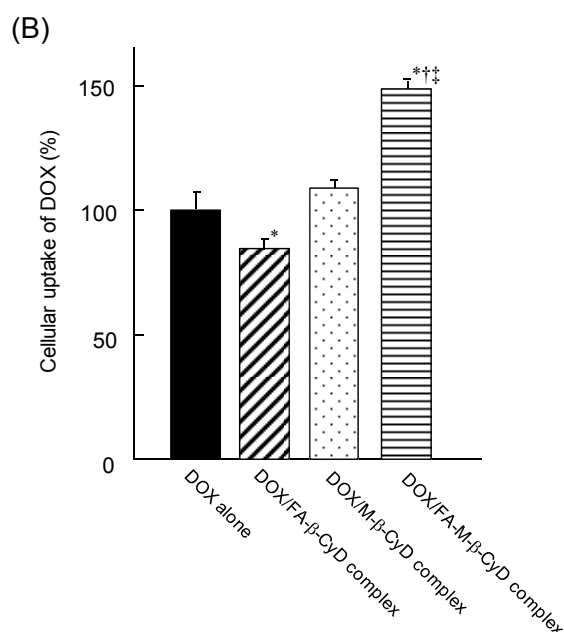
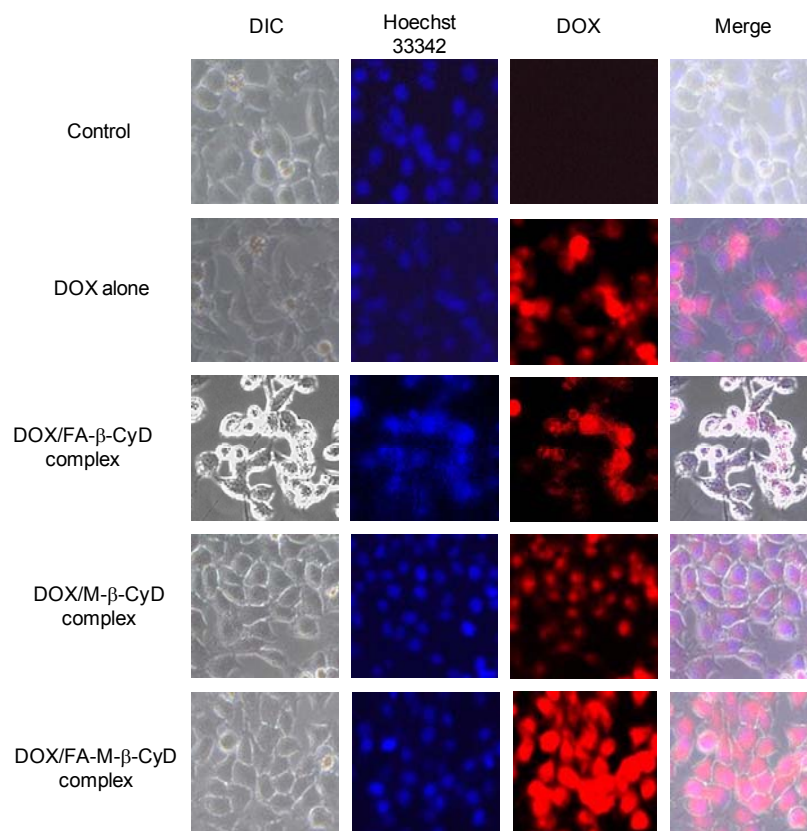


Fig. 25. Cellular Uptake of DOX in DOX/β-CyDs Complexes into KB Cells (FR-α (+)) after Treatment for 1 h

KB cells (1×10^6 cells/well) were incubated with RPMI-1640 medium (FA-free) containing DOX or DOX/β-CyDs complexes at 37°C for 1 h. The molar ratio of DOX/β-CyDs was 1:1. The concentration of DOX was 10 μM. (A) After washed twice with medium, cells were scanned with a fluorescence microscope. (B) The cellular uptake of DOX was determined by BZ-II analyzer. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown. * $p < 0.05$, compared with DOX alone. † $p < 0.05$, compared with DOX/FA-β-CyD complex. ‡ $p < 0.05$, compared with DOX/M-β-CyD complex.

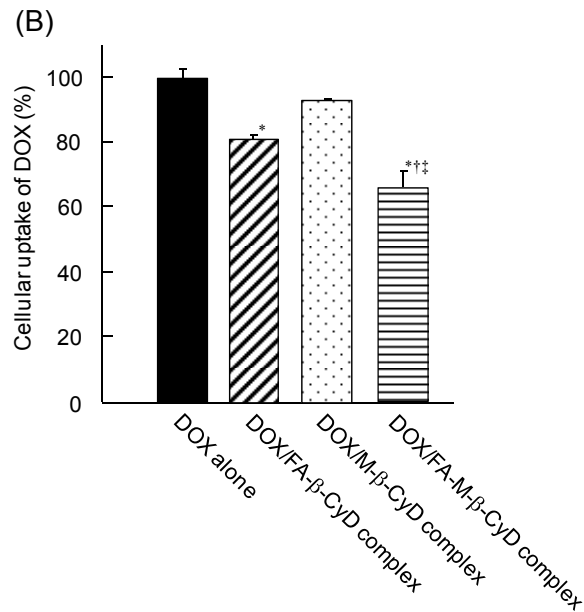
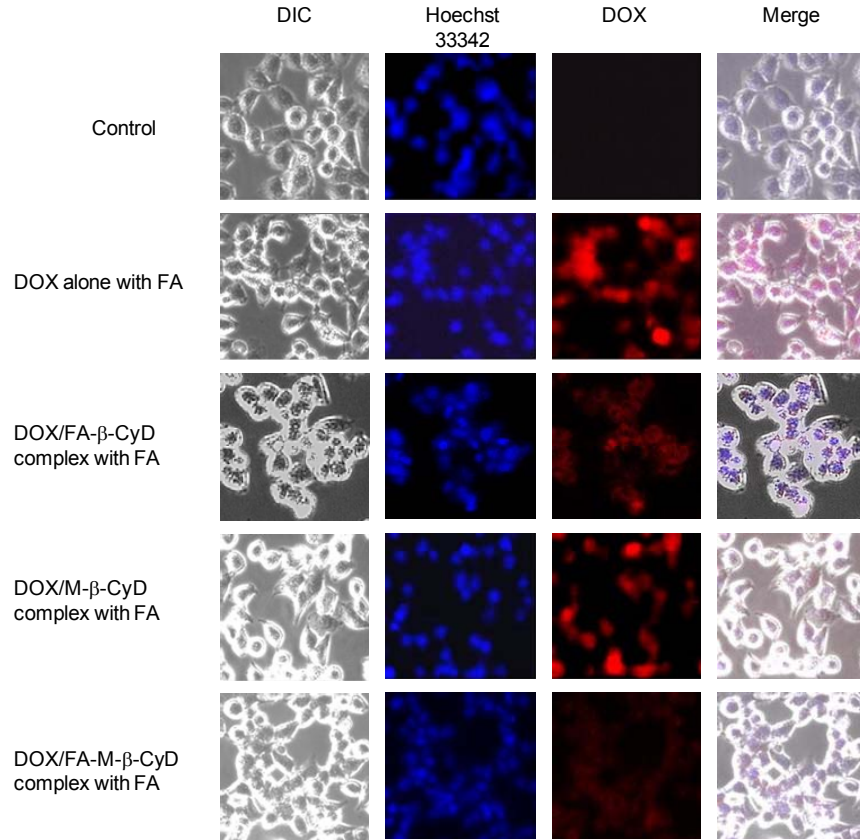


Fig. 26. Effect of FA on Cellular Uptake of DOX in DOX/ β -CyDs Complexes into KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 1 h

KB cells (1×10^6 cells/well) were incubated with RPMI-1640 medium (FA-free) containing DOX or DOX/ β -CyDs at 37°C for 1 h. The molar ratio of DOX/ β -CyDs was 1:1. The concentrations of DOX and FA were 10 μ M and 4 mM, respectively. (A) After washed twice with medium, cells were scanned with a fluorescence microscope. (B) The cellular uptake of DOX was determined by BZ-II analyzer. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown. * $p < 0.05$, compared with DOX alone. † $p < 0.05$, compared with DOX/FA- β -CyD complex. ‡ $p < 0.05$, compared with DOX/M- β -CyD complex.

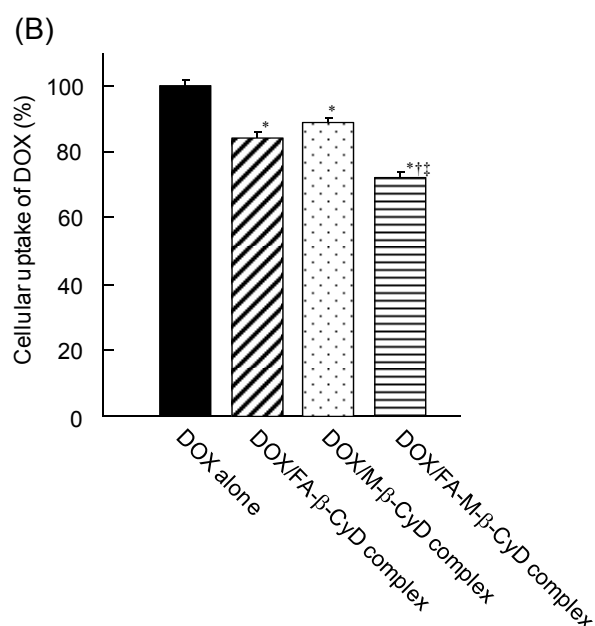
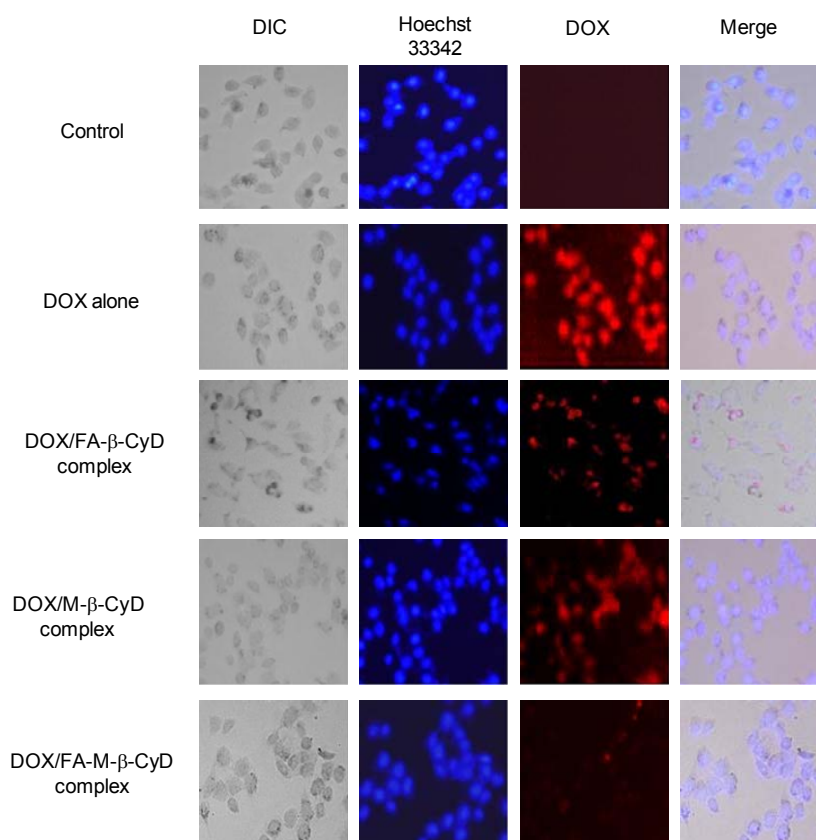


Fig. 27. Cellular Uptake of DOX in DOX/β-CyDs Complexes into A549 Cells (FR-α (-)) after Treatment for 1 h

A549 cells (1×10^6 cells/well) were incubated with DMEM containing DOX or DOX/β-CyDs at 37°C for 1 h. The molar ratio of DOX/β-CyDs was 1:1. The concentration of DOX was 10 μM. (A) After washed twice with medium, cells were scanned with a fluorescence microscope. (B) The cellular uptake of DOX was determined by BZ-II analyzer. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown. * $p < 0.05$, compared with DOX alone. † $p < 0.05$, compared with DOX/FA-β-CyD complex. ‡ $p < 0.05$, compared with DOX/M-β-CyD complex.

第 9 節 DOX の細胞からの排出に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

がん化学療法において克服すべき問題点の一つに、抗がん剤の長期投与によるがん細胞の抗がん剤耐性化がある。現在、多くの耐性化メカニズムが提唱されているが、なかでも、薬物排出トランスポーターである P-gp のがん細胞上への発現誘導が耐性獲得における主要な要因の一つであると考えられている。そこで本節では、DOX の細胞からの排出に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。実験は、DOX/ β -CyDs 複合体を KB 細胞へ 1 時間添加後、細胞外の DOX/ β -CyDs 複合体を除去した。さらに、培地を添加 1 時間後の上清を回収し、細胞内から培養上清中へ排出された DOX 量を蛍光マイクロプレートリーダーにて算出した。

Fig. 28 に示すように、DOX/FA- β -CyD 複合体は DOX の排出を促進する傾向を示したが、M- β -CyD および FA-M- β -CyD は DOX の排出には影響を与えなかった。このことから、本実験条件下、FA-M- β -CyD の薬物排出トランスポーターへの影響は小さいことが示唆された。

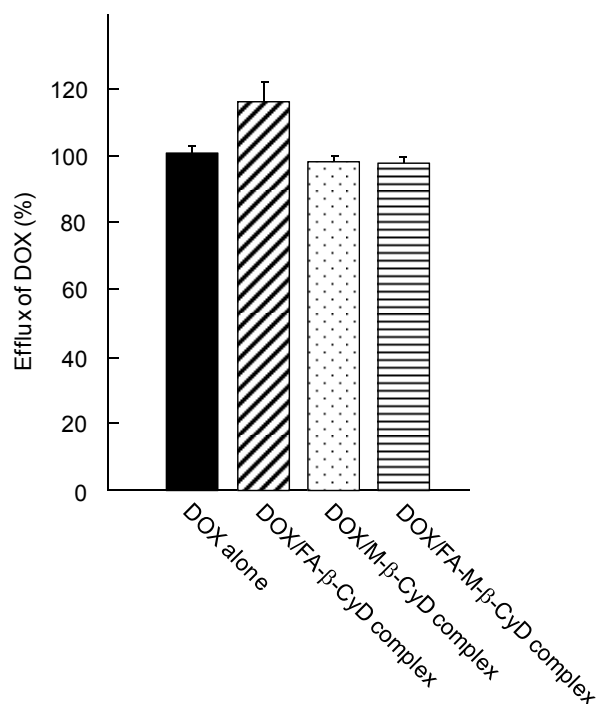


Fig. 28. Effects of β -CyDs on Efflux of DOX from KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 1 h

DOX/ β -CyDs complexes were treated for 1 h. After washing with RPMI-1640 medium (FA-free), KB cells were further incubated with RPMI-1640 (FA-free) for 1 h. The molar ratio of DOX/ β -CyDs was 1:1. The concentrations of DOX and β -CyDs were 10 μ M. The amount of efflux of DOX was determined by a fluorescence microplate reader. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 10 節 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす DOX/FA-M- β -CyD 複合体の影響

DOX は、トポイソメラーゼ II と結合し、DNA 合成を阻害することにより、アポトーシスを誘導する。そこで本節では、DOX のアポトーシス誘導能に及ぼす FA-M- β -CyD の影響をアポトーシス実行因子であるカスパーゼ-3/7 の活性を指標に検討した。なお、本節ではカスパーゼ-3/7 の活性化により生じるアミノルシフェリンの蛍光を指標に、アポトーシス誘導能を蛍光顕微鏡にて観察した。

Fig. 29 は、KB 細胞に DOX 単独および DOX/ β -CyDs 複合体を 12 時間処理後のカスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光強度を示す。なお、DOX 単独処理では、カスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光がほとんど観察されなかったのに対し、DOX/FA- β -CyD および DOX/M- β -CyD 複合体処理ではわずかに蛍光強度が増加した。一方、DOX/FA-M- β -CyD 複合体処理では、カスパーゼ-3/7 の活性化に伴う蛍光強度の著しい増大が観察された。

Fig. 30 は、DOX 単独および DOX/ β -CyDs 複合体を 24 時間処理後の結果を示す。DOX 単独処理では、カスパーゼ-3/7 の活性化に伴う蛍光強度の著しい上昇が観察された。一方、DOX/FA- β -CyD および DOX/M- β -CyD 複合体処理では、12 時間処理時の結果 (Fig. 29) と差異は認められなかった。また、DOX/FA-M- β -CyD 複合体系において 12 時間処理では観察されたカスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光は、24 時間処理では、ほとんど観察されなかった。これは、第 5 節での検討より、DOX/FA-M- β -CyD 複合体適用後 24 時間の細胞生存率は約 30% であり、既に多くの細胞が死滅したために、カスパーゼ-3/7 の活性に由来する蛍光が観察されなかったためと推察される。これらの結果より、FA-M- β -CyD は DOX によるカスパーゼ-3/7 の活性化を促進することが示唆された。

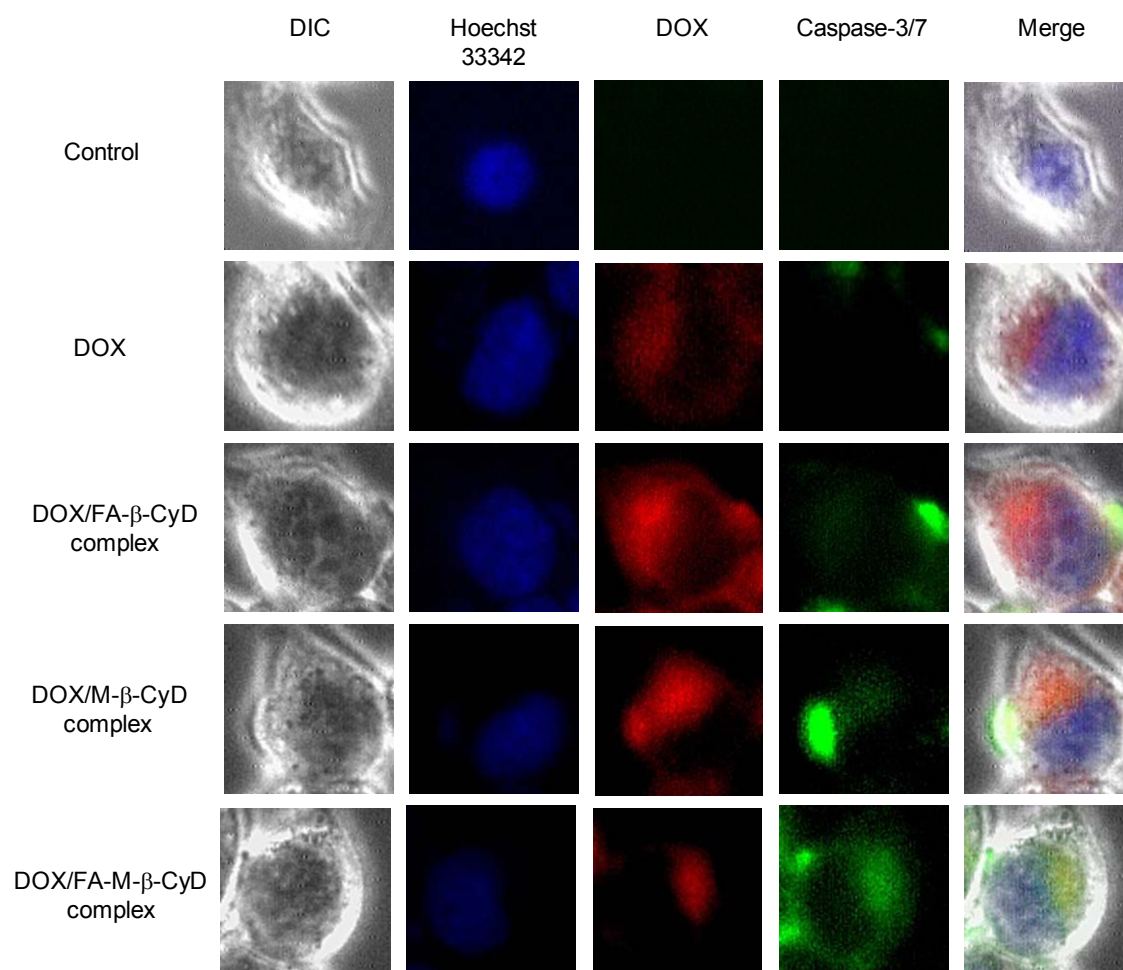


Fig. 29. Effects of β -CyDs on Caspase-3/7 Activity in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 12 h

KB cells (1×10^6 cells/well) were incubated with RPMI-1640 (FA-free) containing DOX or DOX/ β -CyDs at 37°C for 12 h. The molar ratio of DOX/ β -CyDs was 1:1. The concentration of DOX was 10 μ M. After washed twice with medium, and then the cells were treated with caspase-3/7 detection kit. After washed twice with RPMI-1640 medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

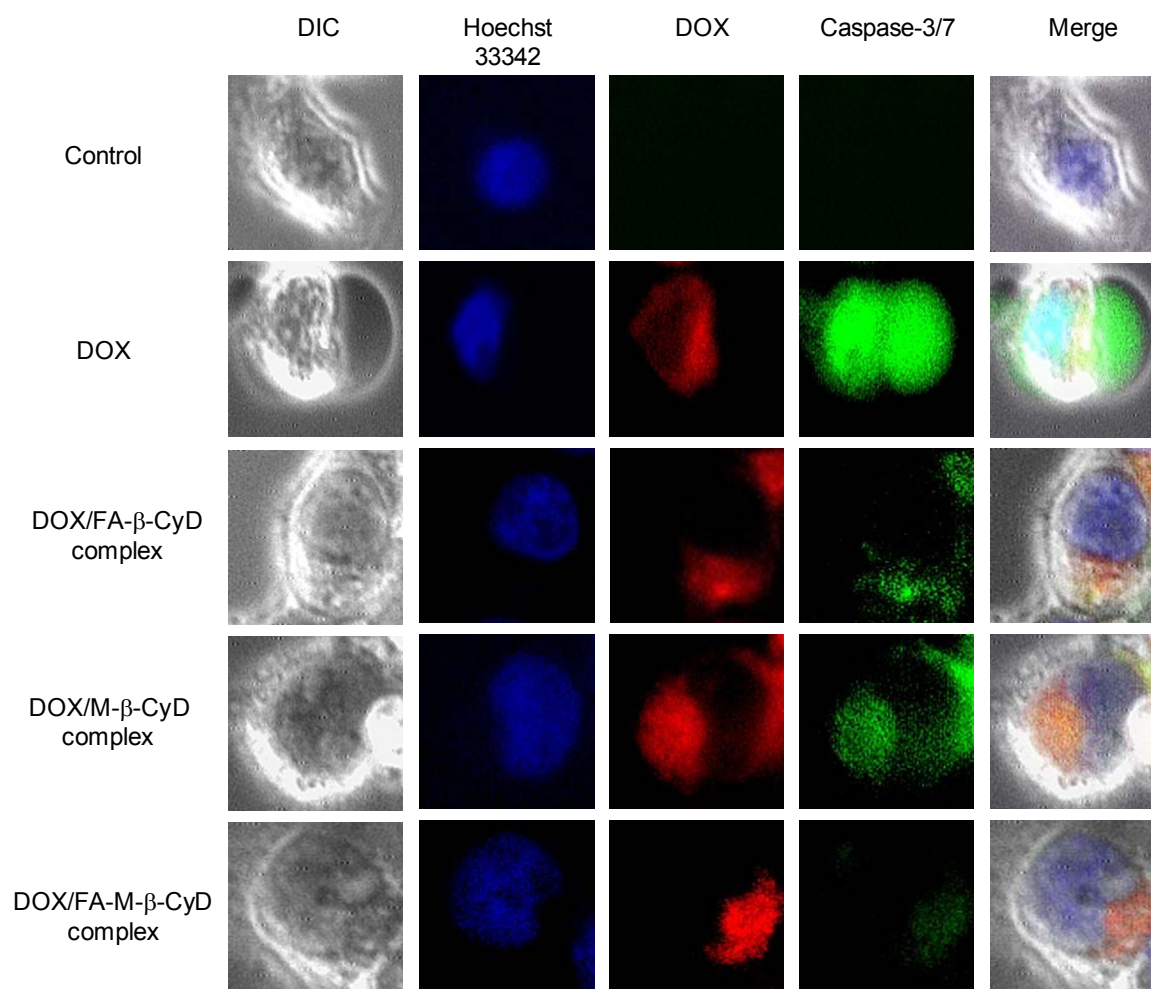


Fig. 30. Effects of β -CyDs on Caspase-3/7 Activity in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 24 h

KB cells (1×10^6 cells/well) were incubated with PRMI-1640 (FA-free) containing DOX or DOX/ β -CyDs at 37°C for 24 h. The molar ratio of DOX/ β -CyDs was 1:1. The concentration of DOX was 10 μ M. After washed twice with medium, and then the cells were treated with caspase-3/7 detection kit. After washed twice with PRMI-1640 medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 11 節 DOX/FA-M- β -CyD 複合体の *in vivo* 抗腫瘍活性

これまでの検討より、FA-M- β -CyD は DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。そこで本節では、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA-M- β -CyD 複合体溶液を静脈内単回投与後の腫瘍体積、体重変化および生存率について検討した。

Fig. 31A は、静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体投与群と比較して、DOX/FA-M- β -CyD 投与群では有意に腫瘍の成長が抑制された。コントロールおよび DOX 単独投与群では、腫瘍体積の増加に伴い、体重の顕著な増加が認められた。(Fig. 31B) 一方、DOX/FA-M- β -CyD 複合体投与群では腫瘍体積の減少に伴い、体重増加は緩やかであった。さらに、Fig. 31C に示すようにコントロール、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体投与群では、65 日目までに全例死亡したのに対して、DOX/FA-M- β -CyD 投与群では、110 日目においても 50% の生存率を示した。

これらの結果より、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体よりも優れた抗腫瘍活性を有することが示された。

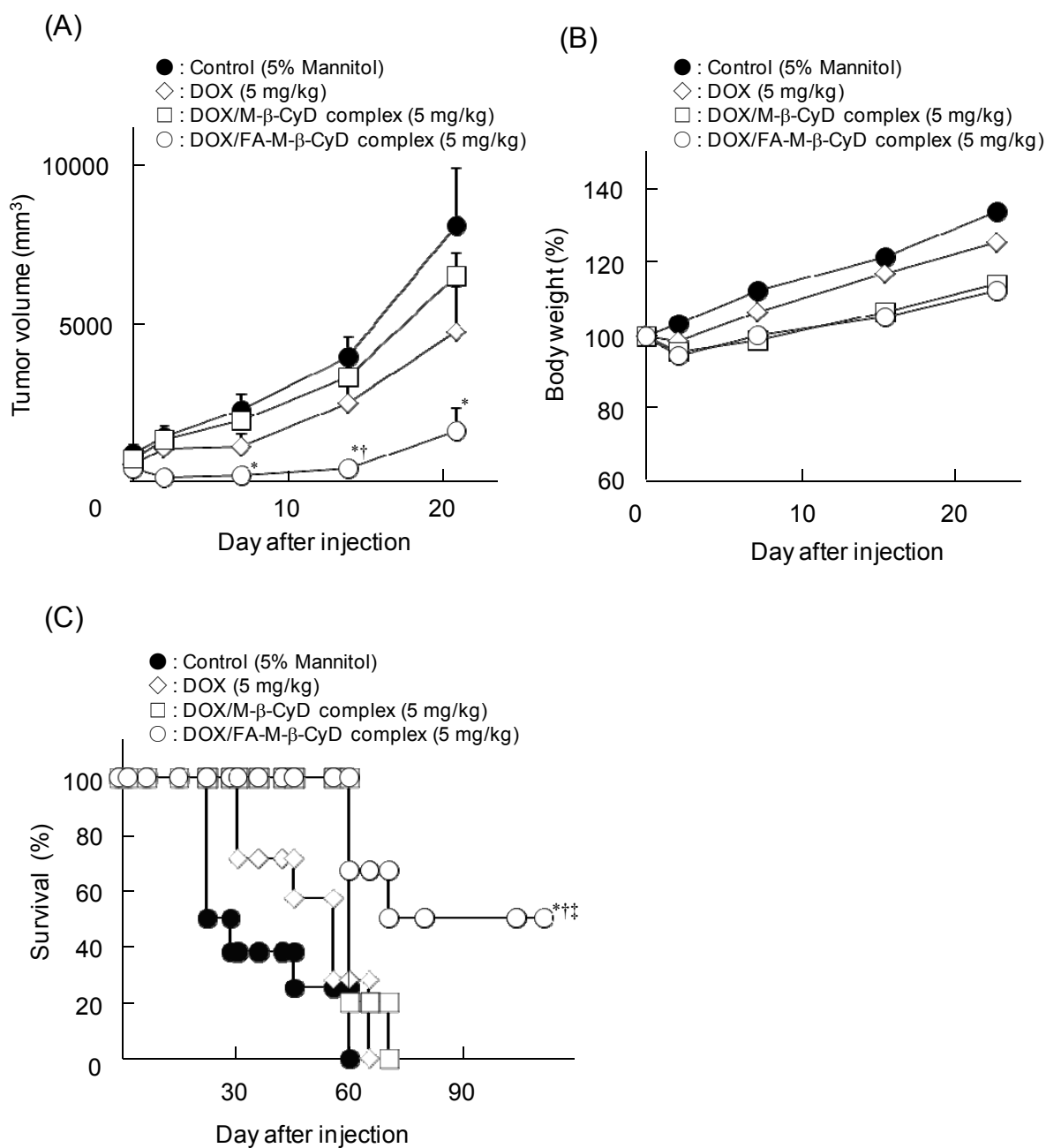


Fig. 31. Effects of Single Intravenous Injection of DOX and DOX/M-β-CyDs Complexes on Tumor Volume (A), Body Weight (B) and Survival Rate (C) in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

DOX (5 mg/kg) with or without M-β-CyDs (15 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to Colon-26 cells-bearing mice. Each points represent the mean \pm S.E. of 5-6 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution). † $p < 0.05$, compared with DOX alone. ‡ $p < 0.05$, compared with DOX/M-β-CyD complex.

第 12 節 DOX/FA-M-β-CyD 複合体投与後の血液生化学的パラメータ

前節において、FA-M-β-CyD は *in vivo* においても DOX の抗腫瘍活性を増強することが示された。また、第 5 節の検討において FA-M-β-CyD は腫瘍選択性を有することから、FA-M-β-CyD は *in vivo* において DOX の副作用を軽減する可能性が示唆される。そこで本節では、DOX 単独、DOX/FA-M-β-CyD 複合体を担がんマウスの尾静脈内に投与 24 時間後の血液生化学的パラメータを測定し、DOX の副作用発現に及ぼす DOX/FA-M-β-CyD 複合体の影響を検討した。なお、血液生化学的パラメータは腎障害の指標として Creatinine (CRE) および Blood urea nitrogen (BUN)、肝障害の指標として Aspartate aminotransferase (AST) および Alanine aminotransferase (ALT)、細胞障害性の指標として Lactate dehydrogenase (LDH)、心毒性の指標として Creatinine kinase (CK) を測定した。

Table 6 に示すように、DOX 単独投与群では AST、LDH および CK の有意な上昇が観察された。一方、DOX/FA-M-β-CyD 複合体投与群では、LDH の上昇はみられなかったが、いずれのパラメータにおいても DOX 単独投与群と比較して低値を示した。

これらの結果より、FA-M-β-CyD は *in vivo* において DOX の副作用を軽減することが示唆された。

Table 6. Blood Chemistry Data after Single Intravenous Injection of the DOX Alone and DOX/FA-M-β-CyD Complex in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

System	CRE ^{a)} (mg/dL)	BUN ^{b)} (mg/dL)	AST ^{c)} (U/L)	ALT ^{d)} (U/L)	LDH ^{e)} (U/L)	CK ^{f)} (IU/L)
Control	0.1 ± 0.0	18.5 ± 2.2	51.6 ± 4.8	17.4 ± 1.3	488 ± 25.0	236.2 ± 231.5
DOX	0.1 ± 0.0	21.1 ± 0.8	155.8 ± 20.7 *	63.0 ± 29.0	1584 ± 138.3 *	1354.8 ± 332.3 *
DOX/FA-M-β-CyD complex	0.1 ± 0.0	18.3 ± 3.2	133.3 ± 28.9	26.3 ± 1.2	1219 ± 152.5 *	669.3 ± 231.5

DOX (5 mg/kg) with or without FA-M-β-CyD (15 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to Colon-26 cells-bearing mice. a) Creatinine, b) Blood urea nitrogen, c) Aspartate aminotransferase, d) Alanine aminotransferase, e) Lactate dehydrogenase, f) Creatinine kinase. Each value represents the mean ± S.E. of 3-6 mice. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution).

第 13 節 考察

本章では、FA-M- β -CyD を新規に調製し、その腫瘍選択的抗がん剤キャリアとしての有用性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

FR には、FR- α 、 β 、 γ の 3 つのアイソフォームが同定されている。なかでも FR- α は、正常細胞と比較して様々な上皮がん細胞選択的に過剰発現しており、その発現量は、腫瘍の悪性度と相関することが知られている。^{74, 75)} また、FR- α は FA の α -カルボキシ基を認識し、CLIC/GEEC エンドサイトーシスにより FA を細胞内に取り込むことが知られている。⁷⁶⁾ 本研究において、FA-M- β -CyD は FA の γ -カルボキシ基と NH₂-M- β -CyD のアミノ基との脱水縮合反応を利用して調製しており、FR- α の認識に必要な FA の α -カルボキシ基は構造中に保持されているものと考えられる。実際、Guaragna らは、FA の γ -カルボキシ基と抗がん剤であるクロラムブシルとの結合体が FR 高発現細胞選択的に認識されることを報告している。⁷⁷⁾ また、Fig. 25 の結果から、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) において効率良く取り込まれること、さらに、FR 競合阻害剤の FA 添加により取り込みが抑制されたことから、FA-M- β -CyD は本実験条件下、FR- α を介した CLIC/GEEC エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれたものと考えられる。

次に、生体内投与時の局所刺激性を予測するため、生体膜モデルとして赤血球を用いて溶血活性を検討した。FA-M- β -CyD は、 β -CyD や M- β -CyD と比較して著しく低い溶血活性を示した。(Fig. 16) さらに、FA-M- β -CyD の溶血開始濃度 (8 mM) は、注射剤として臨床応用されているヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD) の溶血開始濃度 (4 mM)⁷⁸⁾ よりも高値を示したことから、FA-M- β -CyD は局所刺激性が低く、静脈内投与可能な製剤素材として応用が期待される。溶血活性が比較的高い M- β -CyD と比較して FA-M- β -CyD の溶血活性が著しく低かった理由として、FA の立体障害により、CyD と赤血球の形質膜との相互作用が低下したこと、また、FA 修飾により FA-M- β -CyD の界面活性作用が低下したこと、(Fig. 15) などが考えられる。

一般に、薬物/CyD 包接複合体を生体内に投与すると、生体成分との競合包接により薬物は CyD から速やかに解離するため、CyD の薬物包接能を利用して抗がん剤キャリアを構築する場合、薬物と CyD との安定度定数 (K_c) が $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ 以上という極めて強い相互作用が必要とされる。⁷²⁾ 本実験条件下、M- β -CyD と DOX との安定度定数 (モル比 1 : 1) は $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり、Bakkour らが報告した β -CyD と DOX との安定度定数 ($K_c = 1.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$)⁷⁹⁾ よりも約 1000 倍高い値を示した。

(Table 5) M- β -CyD がこのように高い安定度定数を示したのは、メチル基の導入により CyD の疎水性空洞が広がり、DOX とより安定な複合体を形成したためと考えられる。一方、FA-M- β -CyD と DOX との安定度定数 (モル比 1:1) も、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と高値を示し、M- β -CyD の系と同程度であった。(Table 5) これは、FA-M- β -CyD の DOX 包接能が FA 修飾による影響を受けないことを示唆している。実際、FA は M- β -CyD の 1 級水酸基側に導入されていること、また、CyD の 2 級水酸基側から DOX が包接されるという小田らの報告からも支持される。⁸⁰⁾ これらの結果より、FA-M- β -CyD は DOX と極めて安定な包接複合体 ($K_c = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) を形成可能であり、静脈内に投与後、DOX の血中動態を制御できるものと推察された。

次に、DOX/FA-M- β -CyD 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性を検討した結果、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) において DOX の抗腫瘍活性を増強したが、A549 細胞 (FR- α (-)) では増強しなかった。(Figs. 18, 19) 一方、KB 細胞 (FR- α (+)) における DOX/M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性増強作用は認められなかった。これらの結果から FA-M- β -CyD は、FR- α 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を増強することが強く示唆された。また、Gabizon らは KB 細胞 (FR- α (+)) において、FA 修飾 DOX 内封リポソームが FA 未修飾のリポソームと比較して、DOX の細胞内取り込み量を約 10 倍上昇させることを報告しており、⁸¹⁾ FA 修飾により FA-M- β -CyD の細胞内取り込み量が増大したという結果と符合した。(Fig. 25) FA-M- β -CyD が DOX の抗腫瘍活性を増強した理由として、1) FA-M- β -CyD が細胞膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることで膜透過性を亢進し、DOX の受動輸送を促進した、2) DOX の受動輸送に加えて、FA-M- β -CyD が DOX と複合体を形成することにより、CLIC/GEEC エンドサイトーシス経路を介した細胞内取り込み量が増大したことなどが考えられる。しかしながら、FA-M- β -CyD による DOX の抗腫瘍活性増強作用は FA 添加により有意に低下したこと、また、FA-M- β -CyD の前処理および後処理が DOX の抗腫瘍活性に影響を与えなかったことから、(Figs. 23, 24) FA-M- β -CyD による抗腫瘍活性増強は、細胞形質膜との相互作用による DOX の細胞膜透過性の亢進というよりも、FR- α を介した複合体の細胞内取り込みの増大の寄与が大きいものと考えられる。一方、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) において PTX の抗腫瘍活性も上昇させたが、5-FU の抗腫瘍活性には影響を与えなかった。これは疎水性薬物である DOX および PTX が、FA-M- β -CyD と安定な複合体を形成したのに対し、親水性薬物である 5-FU は FA-M- β -CyD と複合体を形成し難かったた

めと考えられる。このことは、M- β -CyD が DOX およびドセタキセルの抗腫瘍活性は増強するが、5-FU の抗腫瘍活性には影響を与えないという Grosse らの報告からも支持される。⁸²⁾ これらのことより、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性増強作用は、抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体が CLIC/GEEC エンドサイトーシスを介して FR- α 高発現がん細胞選択的に取り込まれることに強く起因するものと考えられる。

DOX は、トポイソメラーゼ II を阻害することにより、アポトーシスを誘導することが知られている。⁸³⁾ Fig. 29 による検討から、FA-M- β -CyD は DOX のアポトーシス誘導を促進することが示唆された。これは、FA-M- β -CyD により DOX の細胞内取り込みが亢進するという結果とよく符合した。(Fig. 25) DOX が抗腫瘍効果を発揮するためには、がん細胞内に取り込まれた後、キャリアから解離する必要がある。当研究室では、DOX と FA 7 分岐修飾 β -CyD との複合体の安定度定数が、pH 7.3 条件下では 10^6 M^{-1} であるが、エンドソーム内の低 pH 環境下 (pH 6.5~pH 7.0) では、安定度定数が 10^4 M^{-1} 程度まで低下することを明らかにしている。⁸⁴⁾ このことから DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、FR- α を介して CLIC/GEEC エンドサイトーシス後、エンドソーム内の低 pH で積極的に DOX を解離した可能性が考えられる。

Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA-M- β -CyD 複合体を静脈内に単回投与したところ、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体系と比較して、腫瘍の成長を著しく抑制し、マウスの生存率を有意に改善することが明らかとなった。(Fig. 31) これは、FA-M- β -CyD が DOX と高い安定度定数 ($K_c = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) を有するために、血中でも安定な複合体を形成し、DOX/FA-M- β -CyD 複合体が FR- α を介してがん細胞に取り込まれたためと推察される。近年、トポイソメラーゼ II β をコードする *Top2b* を心筋細胞特異的に欠損させると、DOX 誘導性の DNA 二本鎖切断とミトコンドリア生合成の異常や活性酸素 (ROS) 産生が低下し、進行性の心不全発症が抑制されることから、DOX が誘発する心毒性は心筋細胞のトポイソメラーゼ II β を介することが報告された。⁸⁵⁾ DOX は、投与量が 550 mg/m^2 に達すると 7~26% の症例で心不全を発症することが知られており、DOX の心臓移行量を減少させることは極めて重要である。今回、担がんマウスにおいて FA-M- β -CyD は DOX 単独処理により誘発される CK の上昇を有意に抑制したことから、(Table 6) DOX の心臓移行量を抑制し、心毒性の発症リスクを低減できるものと考えられる。今後、DOX の体内動態や心毒性などの副作用について詳細に解析する必要がある。

第 14 節 小括

本章では、FA-M- β -CyD を新規に調製し、腫瘍細胞選択的な新規抗がん剤キャリアとしての有用性評価を行った。以下に本章で得られた知見を要約する。

- 1) NH₂-M- β -CyD と FA との脱水縮合反応により、FA-M- β -CyD を調製した。¹H-NMR および FAB MS スペクトルにより、FA-M- β -CyD は M- β -CyD と FA がモル比 1:1 で結合していることを確認した。
- 2) FA-M- β -CyD の表面張力は濃度の上昇に伴い低下したが、M- β -CyD と比較して高い値を示した。
- 3) リン酸緩衝液中において FA-M- β -CyD は DOX と極めて安定な複合体を形成し、その安定度定数は、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ という著しく高い値を示した。
- 4) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において DOX および PTX の抗腫瘍活性を増強したが、5-FU の抗腫瘍活性には影響を与えなかった。
- 5) DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、FR- α を介して DOX の細胞内取り込み量を上昇させることで、FR- α 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。
- 6) KB 細胞 (FR- α (+)) への FA-M- β -CyD の前処理および後処理は、DOX の抗腫瘍活性に影響を与えなかったことから、DOX の抗腫瘍活性増強作用には、両者の複合体形成の重要性が示唆された。
- 7) KB 細胞 (FR- α (+)) において FA-M- β -CyD は、DOX によるカスパーゼ-3/7 の活性化を促進することが示唆された。

- 8) Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスにおいて、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、静脈内投与において DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体よりも優れた抗腫瘍活性を示した。
- 9) FA-M- β -CyD は同担がんマウスにおいて、DOX の副作用を軽減することが示唆された。

以上の知見より、FA-M- β -CyD は、*in vitro* および *in vivo* において FR- α 高発現細胞選択的抗がん剤キャリアとして優れた性質を有することが示唆された。

第 2 章 メチル- β -シクロデキストリン (M- β -CyD) の抗腫瘍活性およびその誘導機構の解明

第 1 節 序

CyD は難水溶性薬物の可溶化や安定化、バイオアベイラビリティの改善に広く応用されている。一方、近年では、CyD を製剤素材として利用する以外にも、CyD 自身が薬物として効果を発揮することが報告されている。例えば、 γ -CyD の全ての一級水酸基をカルボキシチオエーテル化した Sugammadex は、アミノステロイド性筋弛緩薬であるロクロニウムやベクロニウムと極めて強固な包接複合体を形成し、($K_c = 10^7 \text{ M}^{-1}$) それら薬物の筋弛緩作用を抑制する筋弛緩回復剤として市販されている。⁸⁶⁾ また、HP- β -CyD は難治性小児脂質蓄積病であるニーマンピックタイプ C 病に対して、神経症状の悪化を抑制することから、医師主導の臨床試験が行われている。最近、木村らは、HP- β -CyD が白血病細胞移植マウスの生存率を著しく上昇させることを見出し、抗がん剤としての HP- β -CyD の有用性を示唆している。⁸⁷⁾ また、当研究室ではジメチルアセチル- β -CyD (DMA7- β -CyD) は、リポポリサッカライド (LPS) アンタゴニストとして機能し、LPS 誘導のエンドトキシンショックを抑制することを報告した。⁸⁸⁾ このように、CyDs は製剤素材に留まらず、自身が医薬品候補になり得る知見が蓄積されている。

前章における検討より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現がん細胞選択的な抗がん剤キャリアとして有用であることを明らかにした。しかし、FR- α 高発現がん細胞に対する FA-M- β -CyD 自体の抗腫瘍活性については不明である。一方、緒言でも述べたが、Grosse らは M- β -CyD を腹腔内に投与した場合、担がんマウスの腫瘍成長が抑制されることを報告した。⁴⁹⁾ そこで本章および第 3 章では、それぞれ M- β -CyD および FA-M- β -CyD 自体の FR- α 高発現がん細胞に対する抗腫瘍活性およびその誘導機構について検討した。本章ではまず、M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスを作成し、腫瘍体積、体重変化、生存率を測定した。また、安全性の観点から、M- β -CyD を担がんマウス尾静脈内に投与後の血液生化学的パラメータを測定した。次に、M- β -CyD の抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図して、KB 細胞 (FR- α (+))、ヒトメラノーマ細胞由来 Ihara 細胞 (FR- α (+))、M213 細胞 (FR- α (+)) に対する M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性、M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込みについて検討した。加えて、細胞死、特にアポトーシス誘導能を検討するため、DNA 含量、ミトコンドリア膜電位、カスパーゼ-3/7 活性に及ぼす M- β -CyD の影響について検討した。

第 2 節 M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性

本節では、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに M- β -CyD 溶液を腫瘍内および尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積、体重変化および生存率について検討した。

Fig. 32A は、腫瘍内投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール群と比較して、DOX および M- β -CyD 投与群いずれにおいても有意に腫瘍の成長が抑制された。また、Fig. 32B はマウスの体重変化を示す。コントロール群の体重は、腫瘍体積の増大に伴い顕著に増大した。また、M- β -CyD 投与群では、腫瘍体積の有意な減少により体重増加は緩やかであった。一方、DOX 投与群では、同程度の抗腫瘍活性を示した M- β -CyD 投与群と比較して体重増加が有意に低下したことから、DOX の副作用発現が推察された。

Fig. 33A は、尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール、DOX および M- β -CyD いずれの投与群においても腫瘍成長の有意な抑制は見られなかった。また、コントロール、DOX および M- β -CyD いずれの投与群においても腫瘍体積の増加に伴い、体重の顕著な増加が認められた。(Fig. 33B) さらに、Fig. 33C に示すようにコントロール、DOX および M- β -CyD 投与群では、70 日目までに全例死亡した。

これらの結果より、M- β -CyD は腫瘍内投与では優れた抗腫瘍活性を示したものの、静脈内投与では十分な抗腫瘍効果を示さないことが示唆された。

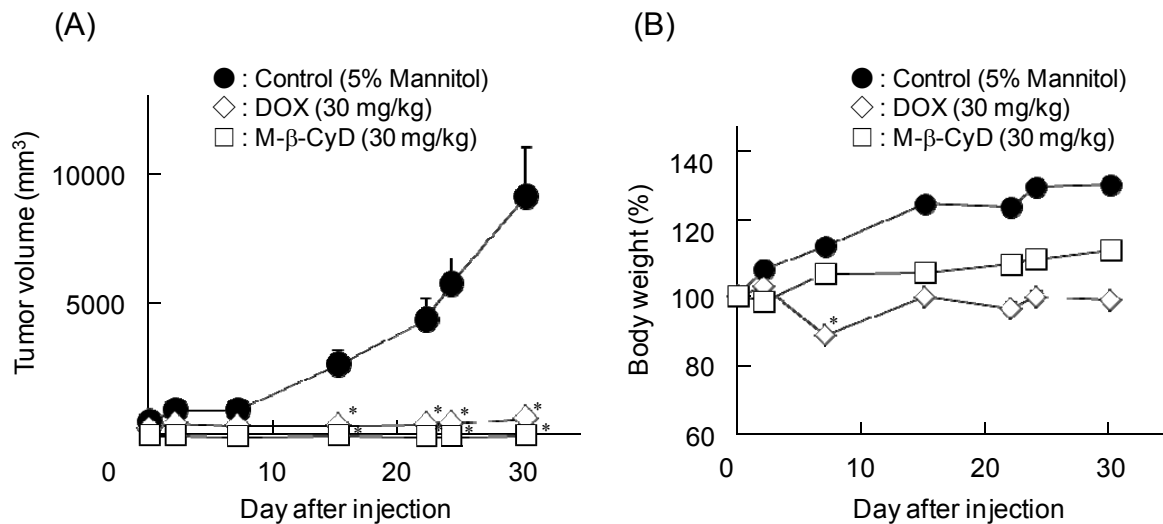


Fig. 32. Effects of Single Intratumoral Injection of M-β-CyD on Tumor Volume (A) and Body Weight (B) in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

DOX or M-β-CyD (30 mg/kg) was administered by the single intratumoral injection to Colon-26 cells-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E. of 3-14 experiments. * p < 0.05, compared with control (5% mannitol solution).

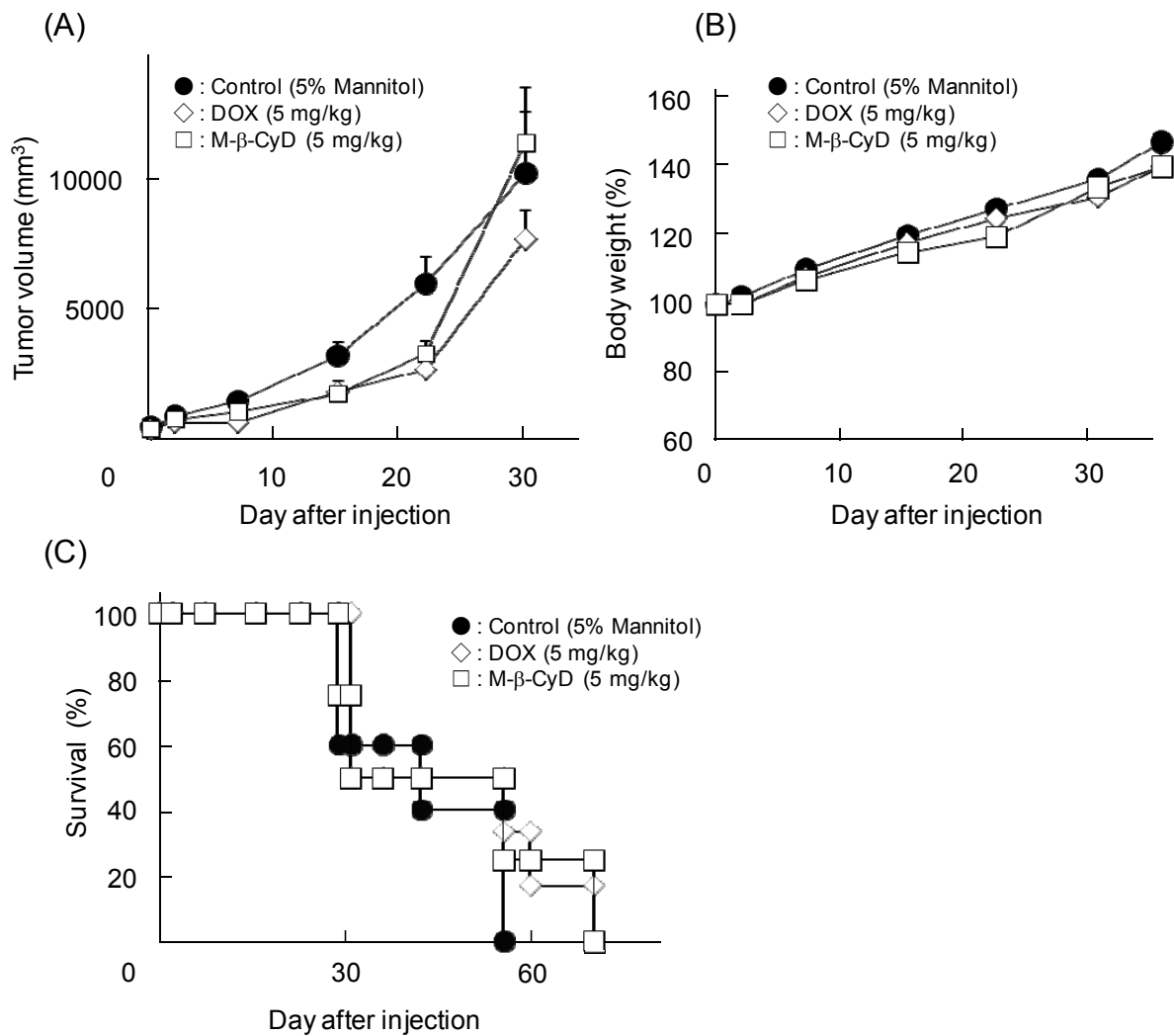


Fig. 33. Effects of Single Intravenous Injection of M-β-CyD on Tumor Volume (A), Body Weight (B) and Survival Rate (C) in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

DOX or M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to Colon-26 cells-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments. Each line represents the survival of 5-7 experiments.

第 3 節 M-β-CyD 投与後の血液生化学的パラメータ

抗がん剤の臨床応用を考えた場合、*in vivo* における安全性を明らかにすることは重要である。そこで本節では、M-β-CyD の *in vivo* における安全性を検討するために、DOX および M-β-CyD を担がんマウスの尾静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学的パラメータを測定した。

Table 7 に示すように、DOX 投与群ではコントロールと比較していずれのパラメータも上昇する傾向を示した。さらに、M-β-CyD 投与群では、コントロールと比較して BUN、AST および LDH において顕著な上昇が確認された。

これらの結果より、本実験条件下、M-β-CyD を静脈内投与した場合、血液または組織に障害性を惹起させることが示唆された。

Table 7. Blood Chemistry Data after Single Intravenous Injection of DOX and M-β-CyD in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

System	CRE ^{a)} (mg/dL)	BUN ^{b)} (mg/dL)	AST ^{c)} (U/L)	ALT ^{d)} (U/L)	LDH ^{e)} (U/L)
Control	0.1 ± 0.0	18.5 ± 2.2	51.6 ± 4.8	17.4 ± 1.3	488 ± 25.0
DOX	0.1 ± 0.0	21.1 ± 0.8	155.8 ± 20.7 *	63.0 ± 29.0	1584 ± 138.3 *
M-β-CyD	0.1 ± 0.0	26.2 ± 1.7 *	189.6 ± 36.1 *	28.0 ± 6.1	1562 ± 203.8 *

DOX or M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to Colon-26 cells-bearing mice.

a) Creatinine, b) Blood urea nitrogen, c) Aspartate aminotransferase, d) Alanine aminotransferase, e) Lactate dehydrogenase. Each value represents the mean ± S.E. of 3-10 mice. **p* < 0.05, compared with control (5% mannitol solution).

第 4 節 M-β-CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性

次に、M-β-CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図して、本節では、KB 細胞 (FR-α (+))、Ihara 細胞 (FR-α (+))、M213 細胞 (FR-α (+)) を用いて、M-β-CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性を WST-1 法により検討した。なお、Ihara 細胞および M213 細胞における FR-α の発現は RT-PCR 法により確認した。(Fig. 34)

Fig. 35 は、M-β-CyD (20 mM) を 2 時間処理後の抗腫瘍活性を示す。いずれの細胞においても、M-β-CyD は有意に高い抗腫瘍活性を示した。これらの結果より、M-β-CyD は、各種がん細胞において優れた抗腫瘍活性を有することが示唆された。

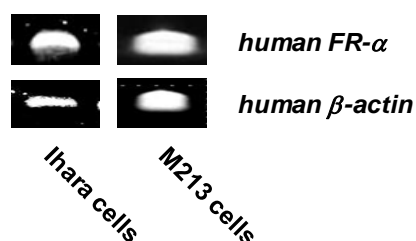


Fig. 34. FR-α mRNA Expression in Ihara Cells and M213 Cells

FR-α mRNA in Ihara cells and M213 cells was detected by RT-PCR. The cycle number was 30.

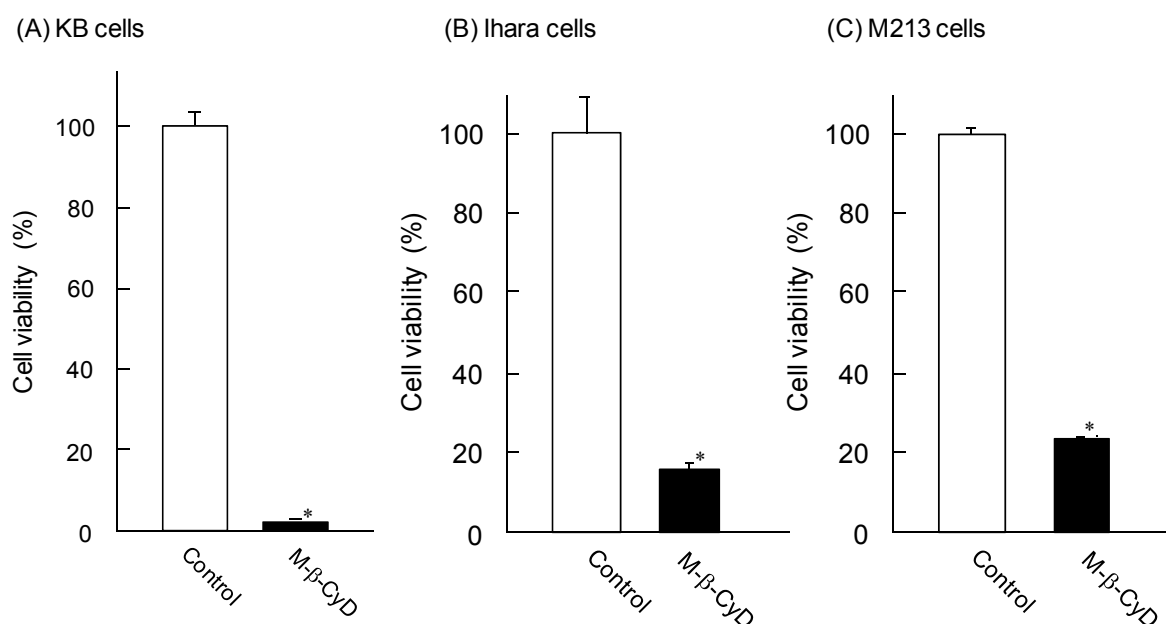


Fig. 35. Antitumor Activity of M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+)) (A), Ihara Cells (FR-α (+)) (B) and M213 Cells (FR-α (+)) (C) after Treatment for 2 h

KB cells, Ihara cells and M213 cells were washed with medium, and then incubated for 2 h with 300 μL of medium containing M-β-CyD at 37°C. After washing twice with PBS to remove M-β-CyD, 300 μL of fresh HBSS and 30 μL of WST-1 reagent were added to plates and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 655 nm was measured. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments. **p* < 0.05, compared with control.

第 5 節 M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込み

一般に、CyD は親水性かつ分子量が約 1000 と大きいことから細胞内に取り込まれにくいものと考えられている。⁷⁸⁾ しかし Plazzo らは、FITC 修飾した M- β -CyD がその量は不明であるが細胞内に取り込まれることを報告している。⁸⁹⁾ そこで本項では、蛍光物質である TRITC をラベル化した TRITC-M- β -CyD を調製して、各種がん細胞との細胞会合をフローサイトメトリーにより検討した。また、TRITC-M- β -CyD の細胞内分布を蛍光顕微鏡にて観察した。

Fig. 36 に示すように、いずれの細胞においても TRITC-M- β -CyD 処理によるヒストグラムのピークのシフトはわずかであったことから、細胞内にほとんど取り込まれないことが示唆された。また、Fig. 37 に示すように、TRITC-M- β -CyD は添加 1 時間後において TRITC 由来の蛍光が観察されなかったことから、M- β -CyD は細胞内に取り込まれにくいことが示唆された。

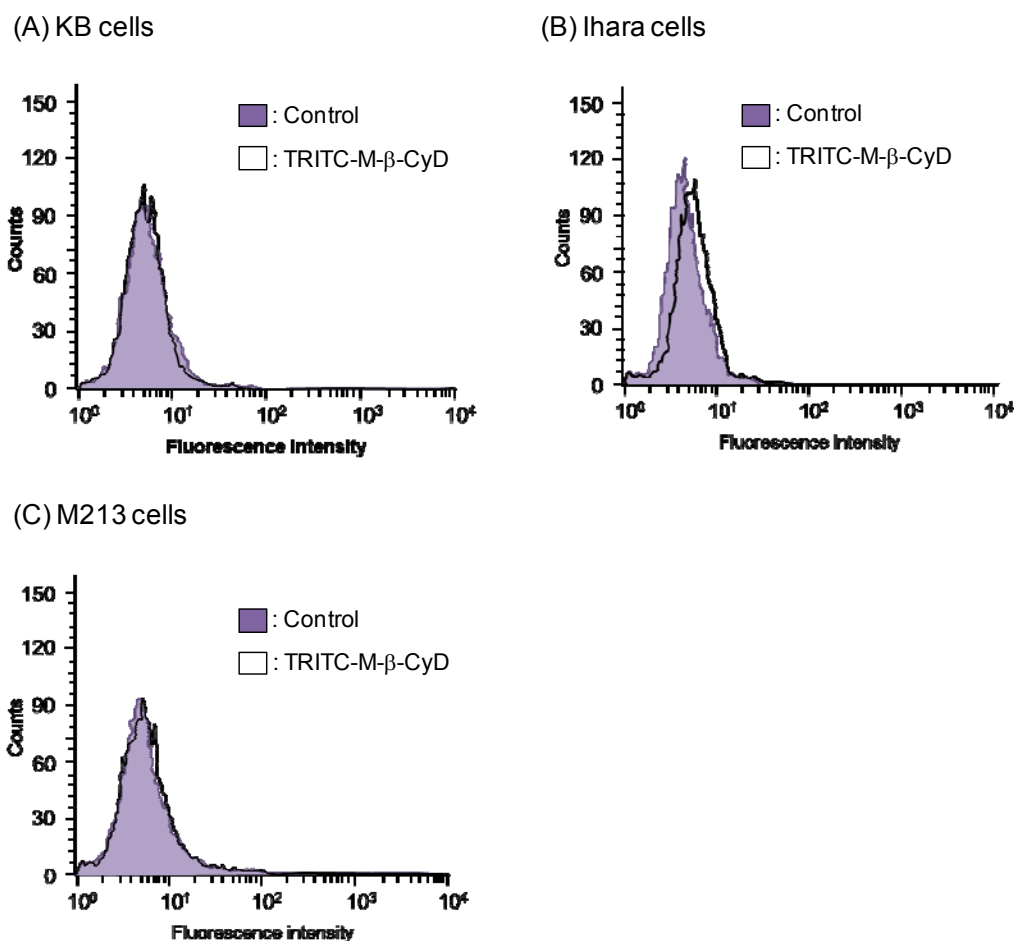


Fig. 36. Cellular Association of TRITC-M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+)) (A), Ihara Cells (FR-α (+)) (B) and M213 Cells (FR-α (+)) (C) after Treatment for 1 h

The fluorescence intensity of TRITC in cells was determined 1 h after incubation at 37°C by a flow cytometer. The concentration of TRITC-M-β-CyD was 10 μM. The experiments were performed independently three times, and representative data are shown.

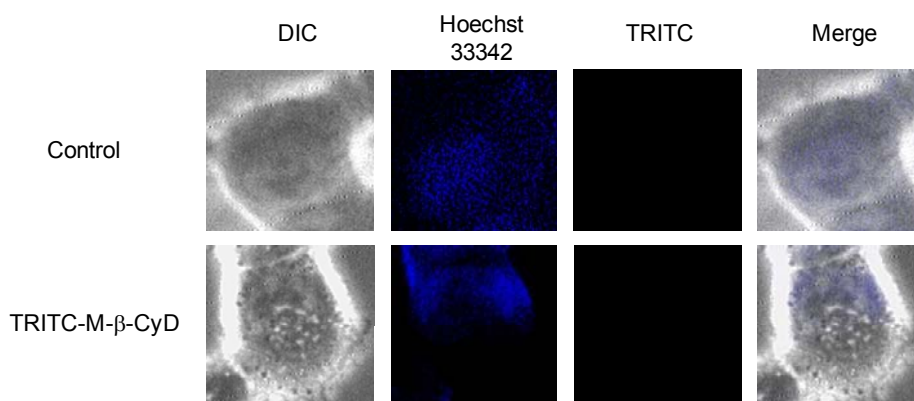


Fig. 37. Intracellular Distribution of TRITC-M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+)) after Treatment for 1 h

KB cells were treated with TRITC-M-β-CyDs (10 μM) for 1 h. After washed twice with culture medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 6 節 DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす M- β -CyD の影響

一般に、細胞死はアポトーシス、ネクローシス、オートファジーの 3 種に分類され、細胞の多くは、さまざまなストレスを加えることによりアポトーシスが誘導される。⁹⁰⁾ アポトーシスは、細胞の形態学的変化と生化学的变化によって定義されており、エンドヌクレアーゼが作用して、DNA がヌクレオソーム単位まで切断されることが知られている。⁹¹⁾ また、アポトーシスシグナルは、ミトコンドリア依存的な経路と非依存的な経路に大別される。特に、ミトコンドリア依存的経路では、ミトコンドリア膜電位の低下やシトクロム *c* などのミトコンドリアタンパク質の細胞質内への放出が観察される。⁹²⁾

そこで本項では、KB 細胞を用いて DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす M- β -CyD の影響について検討した。DNA 含量は、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色後、フローサイトメトリーにて解析した。PI は、膜構造が保たれている場合には細胞膜を通過できないが、エタノール処理等で膜透過性を上昇させると細胞内に入り、DNA の二重らせんにインターカレートして蛍光を発するため、蛍光強度から DNA 含量をフローサイトメトリーで捉えることができる。また、アポトーシスが誘導され DNA が断片化した細胞をエタノール処理などで膜透過性を上昇させると、断片化された DNA は細胞から漏出するため、DNA 含量が低下した細胞をアポトーシス細胞と見なすことができる。また、ミトコンドリア膜電位の変化は、ローダミン 123 にてミトコンドリア膜を染色し、フローサイトメトリーにて解析した。ローダミン 123 は、電位差に応じてミトコンドリアに取り込まれるため、取り込み量を測定することによって膜電位を間接的に測定することができる。

Fig. 38 に示すように、KB 細胞において M- β -CyD (20 mM) を 2 時間適用すると DNA 含量およびミトコンドリア膜電位の有意な低下が認められた。これらの結果より、M- β -CyD は KB 細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

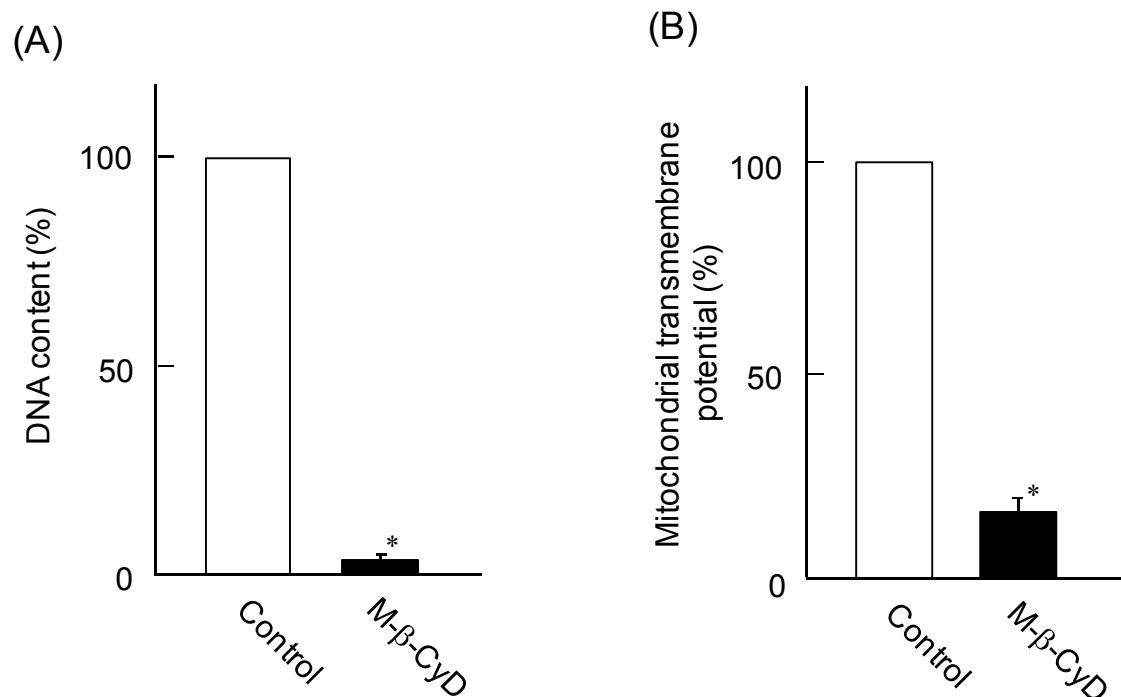


Fig. 38. Effect of M-β-CyD on DNA Content (A) and Mitochondrial Transmembrane Potential (B) in KB Cells (FR-α (+)) for 2 h

KB cells were treated with M-β-CyD (20 mM) for 2 h. (A) Cells were treated with PI, then the percentage of cells showing DNA degradation was analysed by a flow cytometry. (B) Cells were stained with rhodamine 123, and mitochondrial transmembrane potential was analysed by a flow cytometry. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 7 節 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす M- β -CyD の影響

前項では、M- β -CyD によるミトコンドリア膜電位変化について検討した。一般に、ミトコンドリア膜電位の低下により放出されたシトクロム *c* は、種々の基質を限定分解し、アポトーシス実行因子であるカスパーゼファミリーの活性化を誘導することが知られている。そこで本項では、カスパーゼファミリーのなかでも、アポトーシス実行に中心的な役割を果たしているカスパーゼ-3/7 活性に及ぼす M- β -CyD の影響を検討した。なお、カスパーゼ-3/7 の活性は、それにより切断されることで生じるアミノルシフエリンの蛍光を指標に蛍光顕微鏡にて観察した。

Fig. 39 に示すように、M- β -CyD 添加によりカスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光強度の増加が観察された。これらの結果より、M- β -CyD は KB 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。

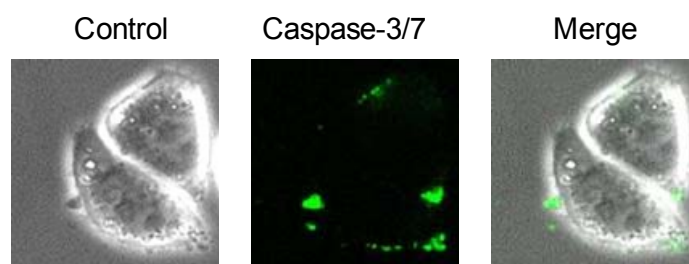


Fig. 39. Effects of M- β -CyD on Caspase-3/7 Activity in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 2 h

KB cells were treated with M- β -CyD (20 mM) for 2 h, and then the cells were treated with caspase-3/7 detection kit. After washed twice with culture medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 8 節 コレステロール漏出に及ぼす M- β -CyD の影響

第 6 節および第 7 節における検討より、M- β -CyD は KB 細胞においてアポトーシスを誘導することが示唆された。また、当研究室では DM- β -CyD が NR8383 細胞において細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを遊離させることでアポトーシスを誘導することを報告している。⁴⁸⁾ そこで本項では、M- β -CyD と細胞形質膜上のリピッドラフトとの相互作用を調べるため、KB 細胞における細胞形質膜から培養上清中へのコレステロール漏出に及ぼす M- β -CyD の影響を検討した。実験は、KB 細胞を M- β -CyD (20 mM) 含有無血清培地で 1 時間処理し、上清中のコレステロールをコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法 (コレステロール E テストワコー[®]) を用いて定量した。Fig. 40 に示すように M- β -CyD は、KB 細胞においてコレステロールを強く漏出させた。これらの結果より、M- β -CyD によるアポトーシス誘導に、細胞形質膜との相互作用の関与が示唆された。

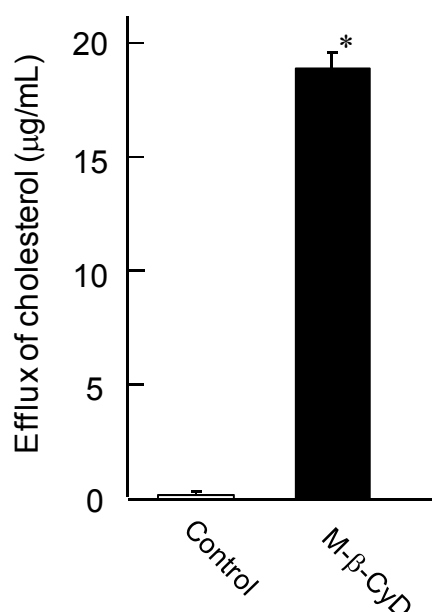


Fig. 40. Effects of M- β -CyD on Efflux of Cholesterol from KB Cells (FR- α (+))

KB cells were incubated with M- β -CyD (20 mM) for 1 h. The concentration of cholesterol in culture medium was determined by Cholesterol E-test Wako[®]. Each value represents the mean \pm S.E. of 4-5 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 9 節 M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすコレステロール添加の影響

前節での検討より、M- β -CyD は KB 細胞上の細胞形質膜からのコレステロールを漏出させることが示唆された。そこで本節では、M- β -CyD のアポトーシス誘導におけるコレステロール漏出の関与を調べるために、外来のコレステロールを予め添加した cholesterol-loading M- β -CyD を調製し、その抗腫瘍活性を検討した。Fig. 41 に示すように、外来のコレステロール添加により M- β -CyD の抗腫瘍活性は有意に抑制された。このことから、M- β -CyD によるアポトーシス誘導には細胞形質膜からのコレステロール漏出の寄与が示唆された。

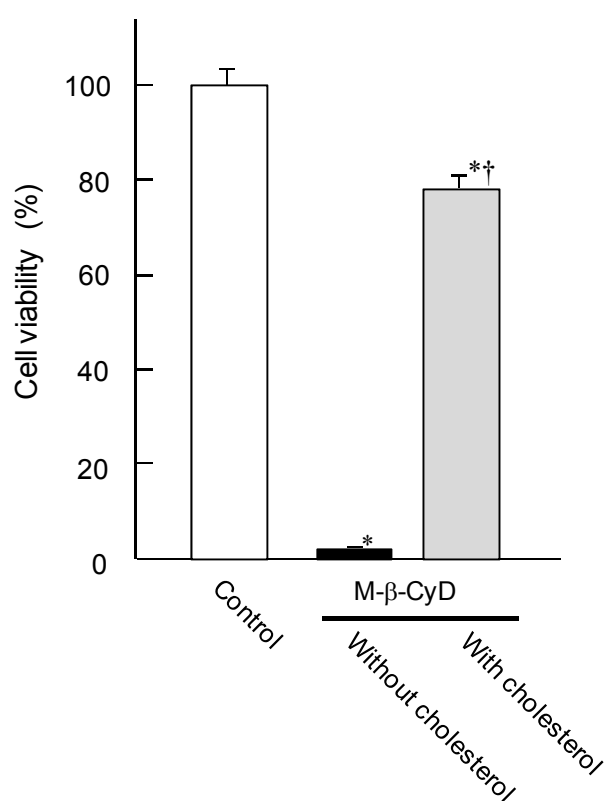


Fig. 41. Effect of Cholesterol on Antitumor Activity of M- β -CyD in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 2 h

The concentrations of M- β -CyD and cholesterol were 20 mM and 100 mg/mL, respectively. Each value represents the mean \pm S.E. of 6-9 experiments. * p < 0.05, compared with control. † p < 0.05, compared with M- β -CyD without cholesterol.

第 10 節 考察

本章では、FA 非修飾体である M- β -CyD による抗腫瘍活性および細胞死誘導機構について検討した。

まず、M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を調べるため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに M- β -CyD を腫瘍内単回投与したところ、DOX と同等の優れた抗腫瘍活性を示した。(Fig. 32A) また、DOX 投与群では副作用の指標である体重減少が観察されたのに対し、M- β -CyD 投与群では体重減少は見られなかったことから、M- β -CyD の腫瘍内投与による副作用は少ないものと考えられる。(Fig. 32B) 今後、M- β -CyD の腫瘍内投与により誘導された細胞死がアポトーシスであるか否かを、TUNEL 法や組織学的手法により明らかにする必要がある。一方、M- β -CyD の静脈内単回投与では腫瘍成長の有意な抑制は見られなかった。(Fig. 33A) 一般に、CyD の血中半減期は数十分であることから、⁹³⁾ M- β -CyD は静脈内投与後すみやかに排泄され、十分に腫瘍組織へ到達できなかったものと考えられる。また、M- β -CyD を静脈内投与後の血液生化学的パラメータを測定したところ、BUN、AST および LDH の有意な上昇が確認されたことから、腫瘍組織以外にも腎臓、肝臓を含む全身の諸臓器に M- β -CyD が分布し、毒性を惹起した可能性が考えられる。(Table 7) これらの結果より、全身投与系において M- β -CyD の抗腫瘍活性を発揮させるためには、腫瘍細胞選択的なりガンド修飾などを行う必要があることが強く示唆される。

次に、M- β -CyD の抗腫瘍活性の機構解明を企図して、まず FR- α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞に対する抗腫瘍活性を評価したところ、M- β -CyD はいずれの細胞においても顕著な抗腫瘍活性を示した。(Fig. 35) 一方、後述の第 3 章第 2 節の結果より、M- β -CyD は FR- α 低発現細胞である A549 細胞に対しても濃度依存的な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。(Fig. 42) これらの結果より、M- β -CyD の抗腫瘍活性に細胞選択性はほとんどないものと考えられる。

一般に、CyD は高水溶性かつ高分子量のため、細胞膜透過性が低く、細胞内に取り込まれにくいことが知られている。⁷⁸⁾ ところが、近年 Plazzo らは FITC 修飾 M- β -CyD がクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を介してヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞内に取り込まれるという、従来の概念とは相反する報告をしている。⁸⁹⁾ そこで、TRITC-M- β -CyD を用いて細胞内取り込みを検討したところ、本実験条件下、KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞のいずれにもほとんど取り込まれないことが

示唆された。(Fig. 36) 今回得られた結果が Plazzo らの結果と異なる理由は明らかではないが、用いた細胞種など実験条件の違いに起因するものと推察される。これらの結果より、M- β -CyD が細胞内に取り込まれることにより、抗腫瘍活性を引き起こす可能性は低いものと推定される。

当研究室ではこれまで、DM- β -CyD が NR8383 細胞において、リピッドラフトからコレステロールを引き抜くことで PI3K-Akt 経路を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告している。⁴⁸⁾ また、長尾らは M- β -CyD がマウスマクロファージ由来 J774.1 細胞や肝臓マクロファージ由来 KC13-2 細胞において、リピッドラフトと相互作用することで膜構造を乱し、LPS のレセプター認識能を低下させ、炎症反応を抑制することを報告している。⁹⁴⁾ さらに、Kiss らは M- β -CyDs がヒト結腸がん細胞由来 Caco-2 細胞において、細胞膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出することでアポトーシスを誘導することを報告している。⁹⁵⁾ 実際、M- β -CyD は KB 細胞の細胞形質膜上のリピッドラフトから培養上清中へコレステロールを強力に漏出させることが示唆された。(Fig. 40) 加えて、コレステロール含有培地における M- β -CyD の抗腫瘍活性は著しく低下することが示唆された。これらの結果より、M- β -CyD は細胞内には取り込まれずに細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、優れた抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。

次に、アポトーシス誘導の指標である DNA 含量およびミトコンドリア膜電位を測定した。その結果、M- β -CyD 処理により DNA 含量およびミトコンドリア膜電位の有意な低下が確認された。(Fig. 38) アポトーシス誘導におけるミトコンドリア膜電位の低下は、Ca²⁺ 濃度依存的にミトコンドリア膜浸透性を変化させる PT (permeability transition) により誘導されるものと考えられている。⁹⁶⁾ PT の正確な分子機構は不明であるが、PT に関わる pore (PTP) の構成成分として、ミトコンドリア外膜の VDAC (voltage-dependent anion channel)、内膜の ANT (adenine nucleotide translocator)、マトリックスのシクロフェリン D のほか、種々のキナーゼが挙げられ、それらで構成される multi protein channel がその実態ではないかと推察されている。⁹⁷⁾ 通常、VDAC は、pore の開閉を調節してミトコンドリアと細胞質間の ATP や呼吸基質などの物質輸送を行っているが、アポトーシス誘導性の Bcl-2 ファミリー分子 Bax が VDAC に結合すると VDAC はより大きな pore を形成し、シトクロム c を放出する。^{98, 99)} 一方、Bcl-xL は VDAC のチャンネル活性を抑制することによってシトクロム c の放出を制御している。¹⁰⁰⁾ また、Bad によるアポトーシス誘導機構は、ミトコンドリア

膜上において、リン酸化が抑制された Bad が Bcl-xL に結合し、アポトーシス抑制活性の阻害に起因することが知られている。これらの知見は、M- β -CyD 処理によるミトコンドリア膜電位の低下は、M- β -CyD による Bad のリン酸化を抑制し、Bad が Bcl-xL に結合した可能性を想起させる。また、ミトコンドリアから放出されたシトクロム *c* は、Apaf-1、ATP およびプロカスパーゼ-9 と結合することでカスパーゼ-9 を活性化し、活性化されたカスパーゼ-9 によりカスパーゼ-3 が活性化されることが知られている。¹⁰¹⁾ 実際、本検討でも、KB 細胞において M- β -CyD はカスパーゼ-3/7 の活性化を誘導することが確認された。(Fig. 39) これらの結果は、M- β -CyD による抗腫瘍活性がミトコンドリア依存的アポトーシスであることを強く示唆している。しかしながら、細胞に取り込まれない M- β -CyD によるミトコンドリア依存的アポトーシスのメカニズムは明らかではない。今後、M- β -CyD 処理後のアポトーシスシグナルについて検討する必要があるが、特に M- β -CyD の抗腫瘍活性は細胞形質膜上のリピッドラフトからのコレステロール漏出効果に起因するものと考えられるため、その直下に存在する PI3K-Akt 経路について詳細に検討する必要がある。

第 11 節 小括

本章では、FA 非修飾体である M- β -CyD の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構について検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスにおいて、M- β -CyD 自体は腫瘍内単回投与では優れた抗腫瘍活性を示したが、静脈内単回投与では十分な効果を示さなかった。また、M- β -CyD を静脈内に単回投与した場合、血液または組織に障害性を惹起させることが示唆された。
- 2) M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+)) および M213 細胞 (FR- α (+)) において優れた抗腫瘍活性を示した。
- 3) KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+)) および M213 細胞 (FR- α (+)) において、M- β -CyD はほとんど細胞内に取り込まれないことが示唆された。
- 4) KB 細胞において、M- β -CyD 処理により DNA 含量およびミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ-3/7 の活性化が観察されたことから、M- β -CyD はミトコンドリア依存的アポトーシスを誘導することが示唆された。
- 5) KB 細胞において、M- β -CyD は細胞形質膜からコレステロールを著しく漏出させた。
- 6) KB 細胞における M- β -CyD の抗腫瘍活性は、外来のコレステロールの添加により有意に抑制された。

以上の知見より、M- β -CyD は腫瘍内単回投与では優れた抗腫瘍活性を示したものの、静脈内単回投与では十分な効果が得られなかったことから、全身投与で M- β -CyD の抗腫瘍活性を発揮させるためには、リガンド修飾による腫瘍選択性の付与が重要であることが強く示唆された。また、M- β -CyD により誘導される抗腫瘍活性は、ミト

コンドリア依存적アポトーシスであり、その抗腫瘍活性誘導に M- β -CyD による細胞形質膜のリピッドラフトからのコレステロール漏出作用の関与が示唆された。

第 3 章 新規腫瘍選択的抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリン (FA-M- β -CyD) の有用性評価

第 1 節 序

第 2 章における検討より、FA 非修飾体である M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性は、腫瘍内単回投与では効果を発揮したものの、静脈内投与では不十分であった。これは、M- β -CyD にがん細胞選択性がないために、静脈内単回投与では腫瘍組織への集積性が乏しく、血液や正常組織に障害を与えたためと考えられる。また、M- β -CyD は細胞膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることでアポトーシスを誘導することが明らかとなった。一方、第 1 章では M- β -CyD にがん標的リガンドとして FA を修飾した FA-M- β -CyD は、FR- α 高発現細胞選択的に DOX の細胞内取り込みを促進させる抗がん剤キャリアとして有用であることを明らかにしたが、FA-M- β -CyD 自体の腫瘍選択的抗腫瘍活性については明らかでない。

そこで本章では、FA-M- β -CyD 自体の腫瘍細胞選択的新規抗がん剤としての有用性評価を行った。まず、FR- α 高発現細胞である KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+))、M213 細胞 (FR- α (+)) および FR- α 低発現細胞である A549 細胞 (FR- α (-)) を用いて、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を検討した。次に、FA-M- β -CyD による抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図して、FA-M- β -CyD のコレステロール漏出効果を検討した。また、FR 競合阻害剤 (FA) および FR- α ノックダウン KB 細胞を用いて、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性および細胞会合に及ぼす FR- α の関与について検討した。さらに、FA-M- β -CyD による細胞死がアポトーシスやオートファジーに関与するか否かを、*in vitro* において検討した。最後に、*in vivo* における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を腫瘍体積、体重変化、生存率で評価し、血液生化学的パラメータの値を指標に安全性を検討した。また、FA-M- β -CyD のこれらの結果を M- β -CyD と比較した。

第 2 節 FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性

本節では、FA-M- β -CyD が FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有するか否かを検討するため、FR- α 高発現細胞である KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+))、M213 細胞 (FR- α (+)) および FR- α 低発現細胞である A549 細胞 (FR- α (-)) を用いて FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。なお、ここでは FA-M- β -CyD の比較対照として、 β -CyD、DM- β -CyD および M- β -CyD の 3 種の β -CyDs を用いた。

FA-M- β -CyD は、KB 細胞において濃度依存的かつ、DM- β -CyD には劣るものの、 β -CyD および M- β -CyD と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。(Fig. 42A) 一方、A549 細胞において DM- β -CyD は KB 細胞と同様に強い細胞障害性を示したが、FA-M- β -CyD は 10 mM まで抗腫瘍活性を示さなかった。(Fig. 42B) さらに、FA-M- β -CyD は Ihara 細胞および M213 細胞においても有意に高い抗腫瘍活性を示した。(Fig. 43) これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有することが示唆された。

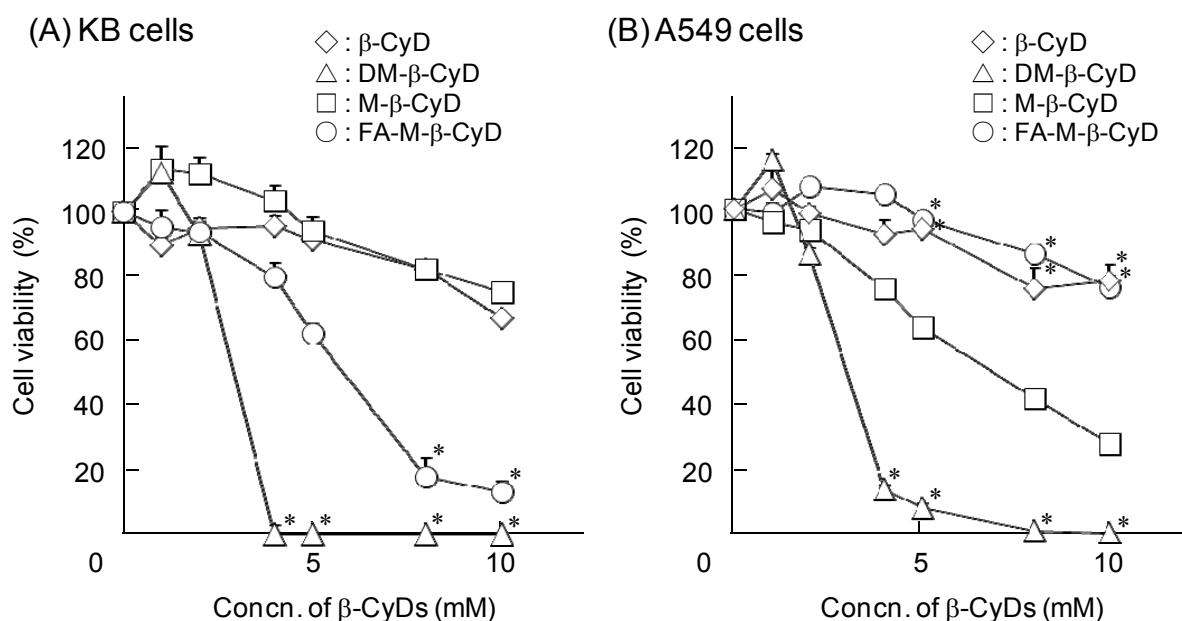


Fig. 42. Antitumor Activity of β -CyDs in KB Cells (FR- α (+)) (A) and A549 Cells (FR- α (-)) (B) after Treatment for 2 h

KB cells and A549 cells were washed twice with PBS, and then incubated for 2 h with 150 μ L of medium containing β -CyDs at 37°C. After washing twice with PBS to remove β -CyDs, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates, and incubated for 20 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * p < 0.05, compared with M- β -CyD.

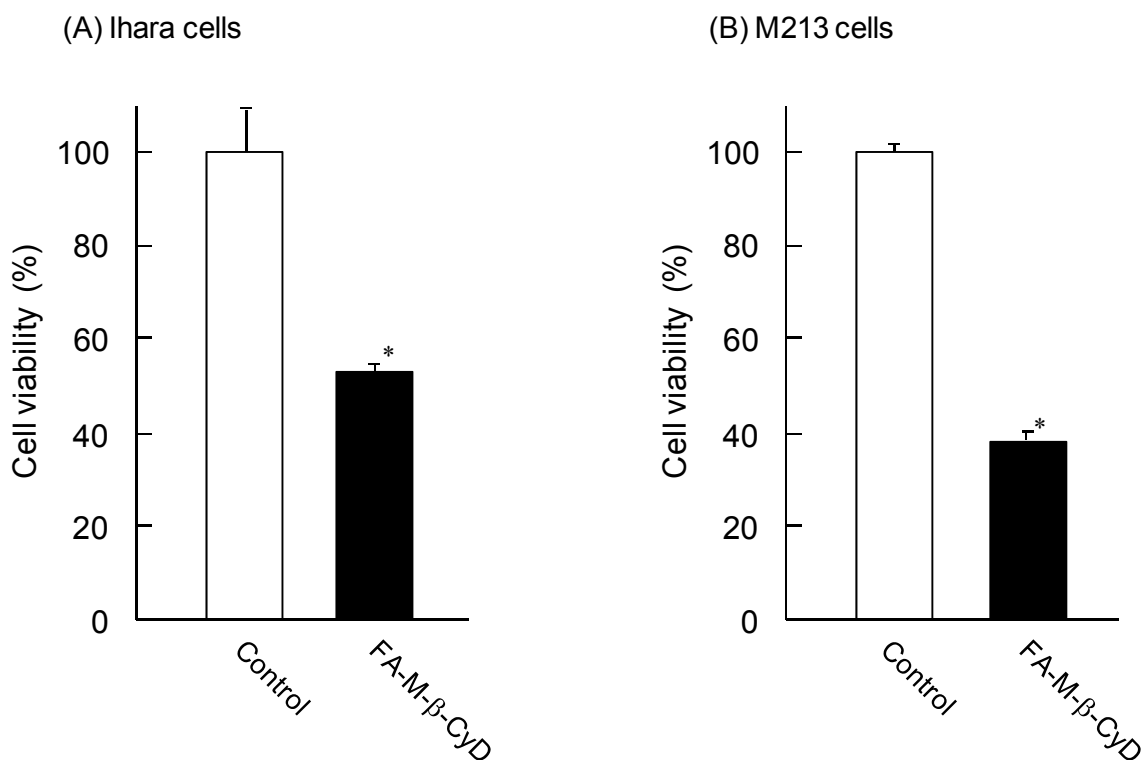


Fig. 43. Antitumor Activity of FA-M-β-CyD in Ihara Cells (FR-α (+)) (A) and M213 Cells (FR-α (+)) (B) after Treatment for 2 h

Ihara cells and M213 cells were washed with medium, and then incubated for 2 h with 300 μ L of medium containing FA-M-β-CyD (10 mM) at 37°C. After washing twice with PBS to remove CyDs, 300 μ L of fresh HBSS and 30 μ L of WST-1 reagent were added to plates, and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 655 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 3 節 FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性誘導機構

第 1 項 コレステロール漏出に及ぼす各種 β -CyDs の影響

第 2 章の検討より、M- β -CyD は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、KB 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。そこで本項では、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) における FA-M- β -CyD のコレステロール漏出能について検討した。実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を各種 β -CyDs 含有無血清培地で 1 時間処理し、上清中のコレステロールをコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法 (コレステロール E テストワコー®) を用いて測定した。(Fig. 44) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) において、M- β -CyD および DM- β -CyD よりもコレステロールを強く漏出させた。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 発現の有無に関わらず、細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを強く漏出させることが示唆された。先の検討より、A549 細胞 (FR- α (-)) における抗腫瘍活性は、FA-M- β -CyD よりも M- β -CyD の方が有意に高かったことから、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性誘導には細胞形質膜との相互作用の寄与は低いことが示唆された。

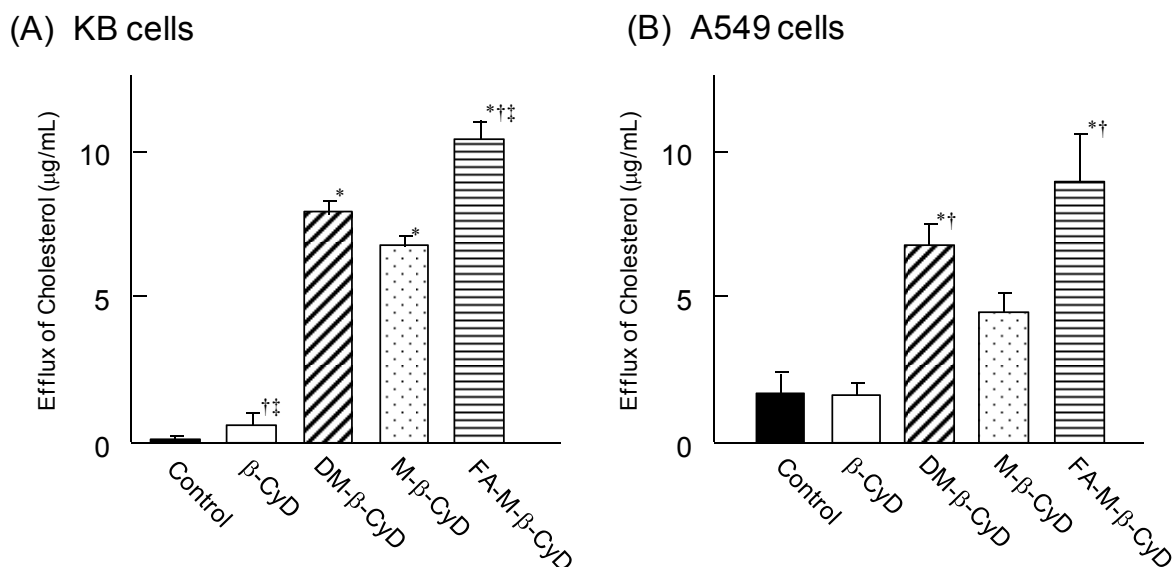


Fig. 44. Effects of β -CyDs on Efflux of Cholesterol from KB Cells (FR- α (+)) (A) and A549 Cells (FR- α (-)) (B)

KB cells and A549 cells were incubated with β -CyDs (5 mM) for 1 h. The concentration of cholesterol in culture medium was determined by Cholesterol E-test Wako®. Each value represents the mean \pm S.E. of 4-5 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M- β -CyD. ‡ $p < 0.05$, compared with DM- β -CyD.

第 2 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼす葉酸レセプター (FR) の影響

第 2 節の結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 発現細胞選択的に優れた抗腫瘍活性を有することが示唆された。そこで本節では、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性が FR- α を介するか否かを FR 競合阻害剤を用いて検討した。

Fig. 45 は FR 競合阻害剤である FA (1 mM) 存在下、各種 β -CyDs (0-10 mM) を 2 時間処理後の抗腫瘍活性を示す。 β -CyD、DM- β -CyD および M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA 添加の影響を受けなかった。(Fig. 45A-C) 一方、FA 添加系における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA 非添加系と比較して有意に低下した。(Fig. 45D) 次に、FR- α ノックダウン KB 細胞における FA-M- β -CyD (5 mM) の抗腫瘍活性を検討した。なお、FR- α の発現は RT-PCR 法にて確認した。(Fig. 46) FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、コントロール siRNA (siControl) をトランスフェクションした KB 細胞と比較して、FR- α ノックダウン KB 細胞において有意に低下した。(Fig. 47)

これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α を介することが強く示唆された。

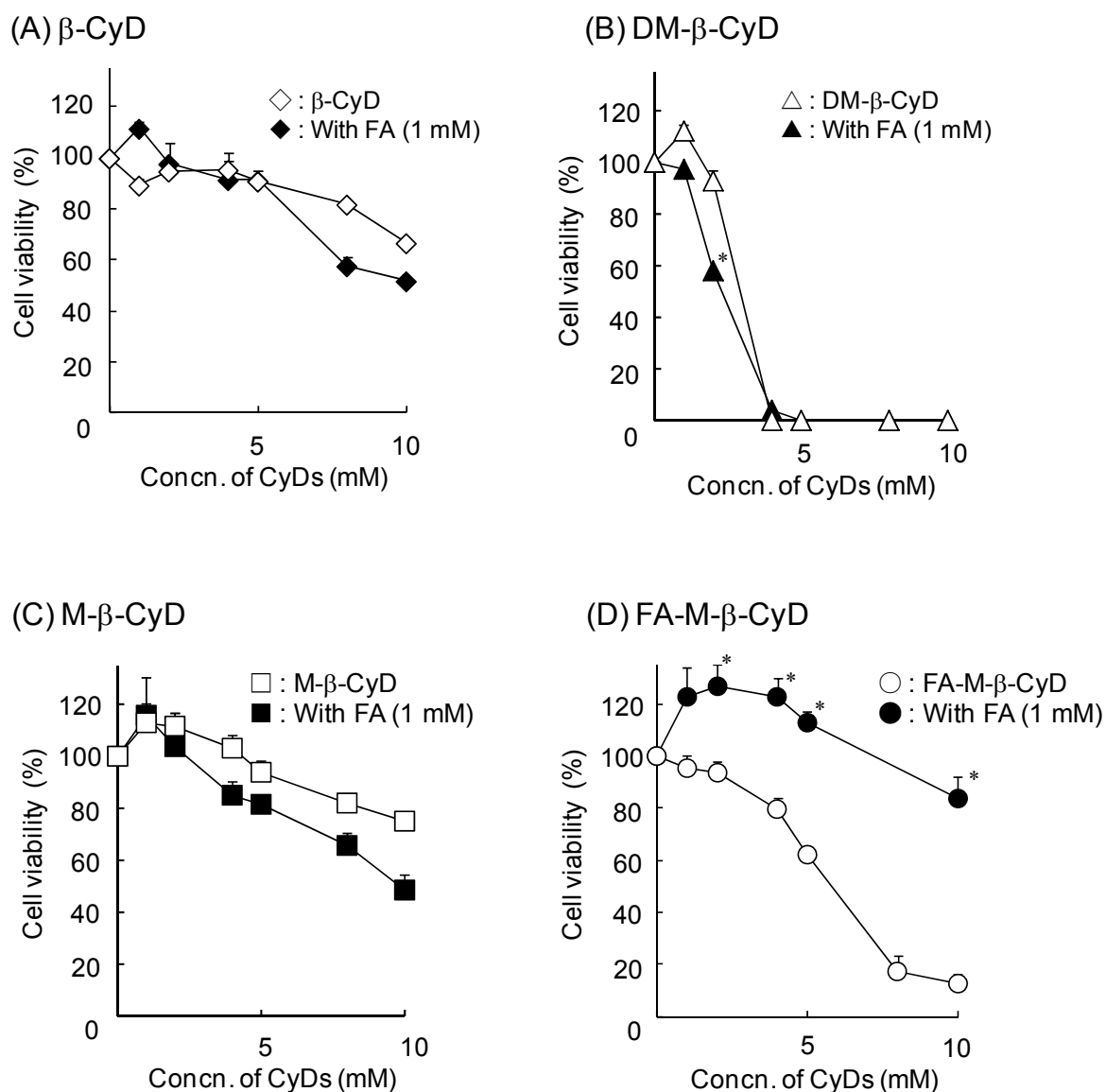


Fig. 45. Effect of FA on Antitumor Activity of β -CyDs in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were pretreated with 150 μ L of medium containing 1 mM FA at 37°C for 1 h, and then incubated with 150 μ L of medium containing β -CyDs (0-10 mM) and FA (1 mM) at 37°C for 2 h. After washing twice with PBS to remove β -CyDs, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated at 37°C for 20 min. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * p < 0.05, compared with β -CyDs.

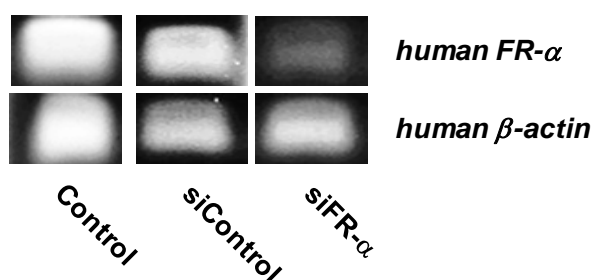


Fig. 46. *FR-α* mRNA Expression after Transfected with siFR- α in KB Cells

The *FR-α* mRNA was detected by RT-PCR method. The cycle number was 30.

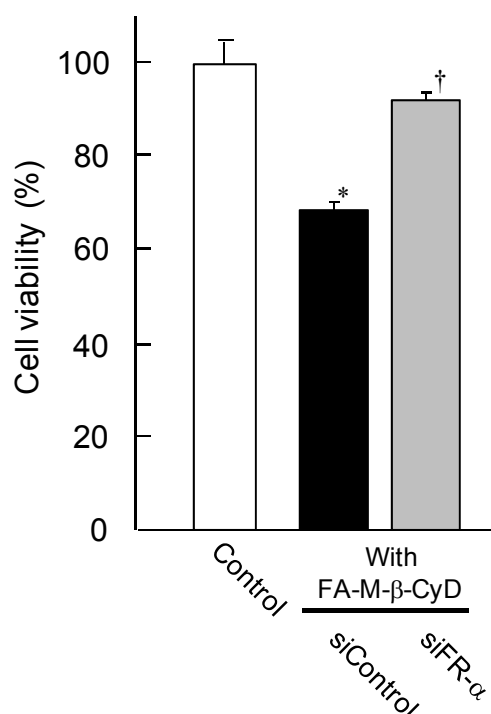


Fig. 47. Antitumor Activity of FA-M- β -CyD in *FR-α* Knockdown KB Cells (*FR-α* (+))

KB cells were incubated with 150 μ L of medium containing FA-M- β -CyD (5 mM) at 37°C for 2 h. After washing twice with PBS to remove FA-M- β -CyD, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated at 37°C for 20 min. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-6 experiments. * p < 0.05, compared with control. † p < 0.05, compared with FA-M- β -CyD in siControl-transfected KB cells.

第 3 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシス阻害の影響

前項において、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性誘導は、FR- α を介することが示唆された。一般に、リガンド修飾された分子は受容体を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。このエンドサイトーシスは、駆動力となるエネルギーを必要とするが、これは低温処理により顕著に阻害される。そこで本項では、KB 細胞 (FR- α (+)) における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシスの関与を検討した。実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) に FA-M- β -CyD を添加した後、4°C でインキュベーションすることによりエンドサイトーシスを阻害し、細胞生存率を算出した。Fig. 48 に示すように、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は低温処理により有意に抑制された。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、抗腫瘍活性を示すことが示唆された。

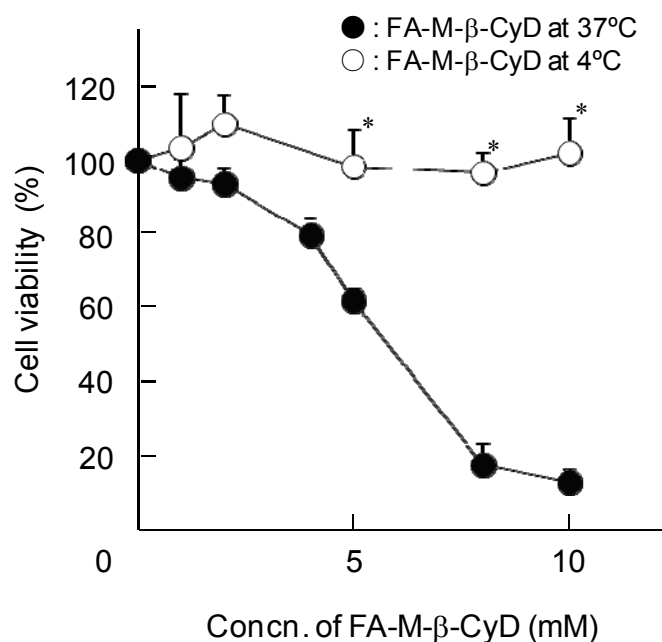


Fig. 48. Effect of Endocytosis Inhibition on Antitumor Activity of FA-M- β -CyD in KB cells (FR- α (+)) after Treatment for 2 h

KB cells were incubated for 2 h with 150 μ L of medium containing FA-M- β -CyD (0-10 mM) at 4°C or 37°C. After washing twice with PBS to remove FA-M- β -CyD, 100 μ L of fresh HBSS and 10 μ L of WST-1 reagent were added to plates and incubated for 20 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * p < 0.05, compared with FA-M- β -CyD at 37°C.

第 4 項 FA-M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込み

一般に、CyD は親水性かつ分子量が約 1000 と大きいことから細胞内に取り込まれにくいことが知られている。⁷⁸⁾ 実際、第 2 章第 3 節での検討より、M- β -CyD は細胞内にほとんど取り込まれないことを明らかにした。しかし、本節第 1 項において FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的に優れた抗腫瘍活性を有すること、さらにその抗腫瘍活性誘導に FR- α を介した細胞内取り込みが関与することが示唆された。そこで本項では、TRITC を付加した TRITC-FA-M- β -CyD を用いて、各種 FR- α 高発現細胞との細胞会合に及ぼす FR 競合阻害剤の影響を検討した。また、FR- α ノックダウン KB 細胞を用いて、TRITC-FA-M- β -CyD の細胞会合に及ぼす FR- α の影響も検討した。実験は 4 mM FA 存在下、10 μ M TRITC-FA-M- β -CyD 添加後 1 時間における TRITC の蛍光強度をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡により評価した。また、細胞内分布を蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を 1 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地で 1 時間処理した後、1 M 水酸化ナトリウムで細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた FA の蛍光強度を蛍光分光光度計にて評価した。

TRITC-FA-M- β -CyD は KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞と会合することが示唆された。(Fig. 49A-C) また、TRITC-FA-M- β -CyD のヒストグラムのピークは、FA 添加により左側にシフトした。(Fig. 49A-C) また、FR- α ノックダウン細胞においても TRITC-FA-M- β -CyD の細胞会合は抑制されることが示唆された。(Fig. 49D) また、蛍光顕微鏡による観察から、TRITC-FA-M- β -CyD は KB 細胞内に取り込まれることが確認された。(Fig. 50)

さらに、FA の蛍光強度を指標に、FA-M- β -CyD の細胞会合量を調べたところ、KB 細胞に対する FA-M- β -CyD の会合量は、A549 細胞の系よりも有意に高いことが示唆された。(Fig. 51)

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞と FR- α を介して細胞会合することが強く示唆された。さらに、Fig. 50 に示すように、TRITC-FA-M- β -CyD は添加 1 時間後において細胞質に TRITC 由来の蛍光が観察されたことから、M- β -CyD とは対照的に細胞内に取り込まれることが確認された。

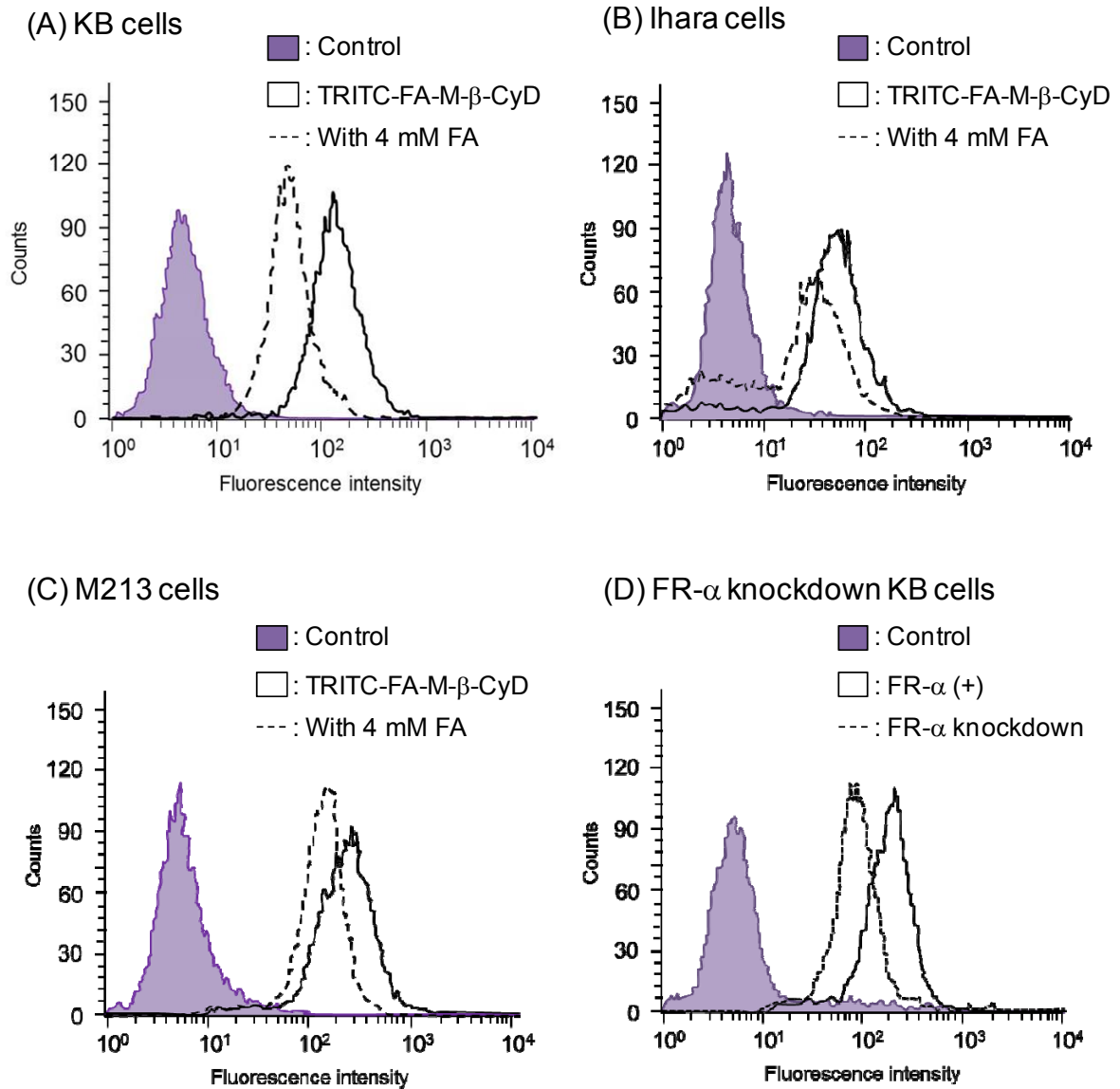


Fig. 49. Cellular Association of TRITC-FA-M- β -CyD in KB Cells (FR- α (+)) (A), Ihara Cells (FR- α (+)) (B), M213 Cells (FR- α (+)) (C) and FR- α Knockdown KB Cells (D) after Treatment for 1 h

The fluorescence intensity of TRITC in cells was determined 1 h after incubation at 37°C by a flow cytometer. The concentration of TRITC-FA-M- β -CyD was 10 μ M. The experiments were performed independently three times, and representative data are shown.

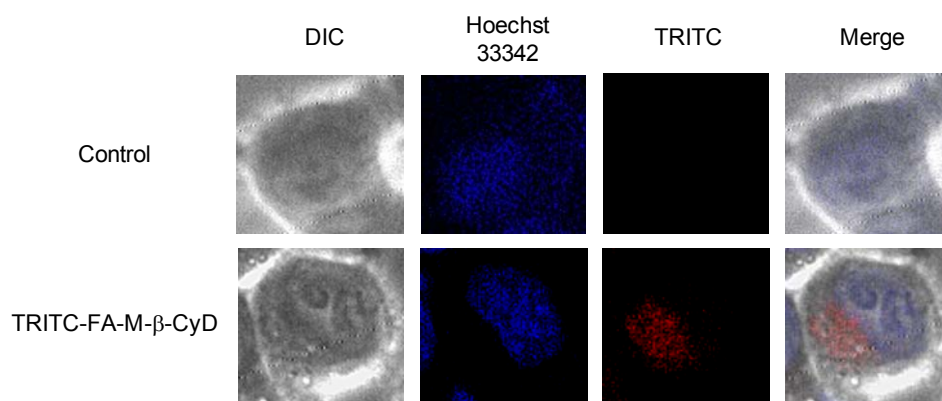


Fig. 50. Intracellular Distribution of TRITC-FA-M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+)) after Treatment for 1 h

KB cells (1×10^6 cells/well) were incubated for 24 h with RPMI medium (FA-free) at 37°C. KB cells were treated with TRITC-FA-M-β-CyD (10 μM) for 1 h. After washed twice with RPMI medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

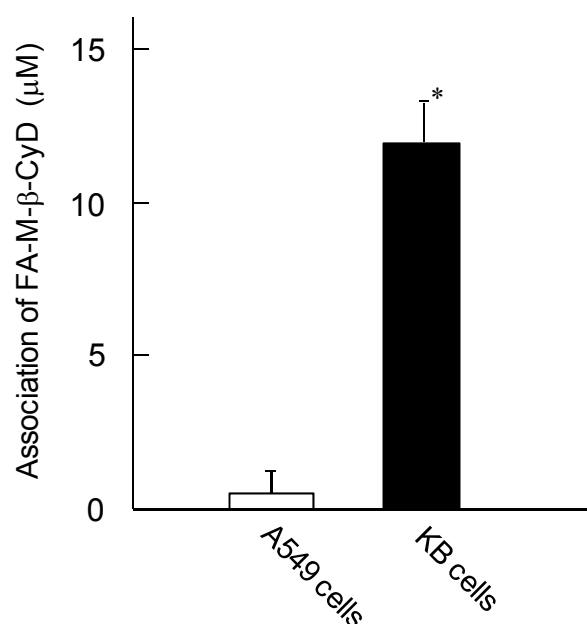


Fig. 51. Cellular Association of FA-M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+)) and A549 Cells (FR-α (-))

KB cells and A549 cells were incubated with FA-M-β-CyD (1 mM) at 37°C for 1 h. The concentration of FA-M-β-CyD associated with cells was determined by a fluorescence spectrophotometer. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, compared with A549 cells.

第 5 項 DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

第 2 章での検討より、KB 細胞において M- β -CyD はアポトーシスを誘導することが示唆された。そこで本項では、FA-M- β -CyD により誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かを DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化を指標に検討した。なお、第 2 章での実験条件とは異なり、本項以降の *in vitro* 実験において、M- β -CyD は KB 細胞に対して細胞死を誘導しない濃度で検討した。

Fig. 52 は、KB 細胞に M- β -CyDs (10 mM) を 2 時間適用後の DNA 含量を示す。DM- β -CyD 処理では、DNA 含量の有意な低下が認められた。一方、M- β -CyD および FA-M- β -CyD 処理では、コントロールとほぼ同程度の DNA 含量を示した。

Fig. 53 は、各種 M- β -CyDs (10 mM) を 2 時間適用後のミトコンドリア膜電位および FA 添加の影響を示す。DM- β -CyD および M- β -CyD の添加により、KB 細胞のミトコンドリア膜電位が有意に低下した。一方、FA-M- β -CyD 処理ではミトコンドリア膜電位は顕著に上昇した。また、FA の添加により、FA-M- β -CyD により惹起されたミトコンドリア膜電位の上昇はコントロールレベルまで低下した。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞に対して、アポトーシスを誘導しない可能性が示唆された。

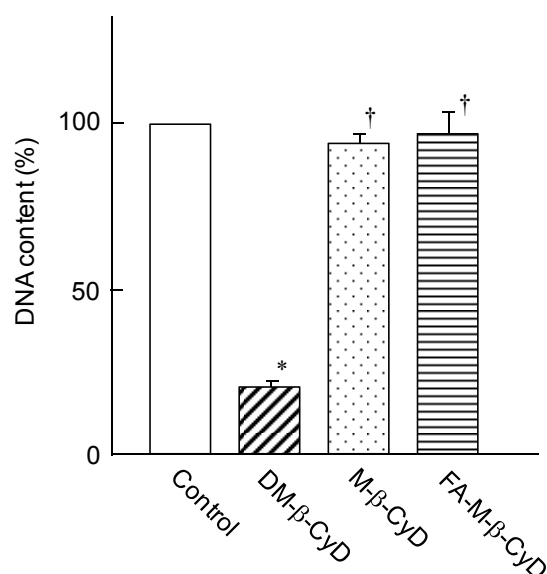


Fig. 52. Effect of M-β-CyDs on DNA Content in KB Cells (FR-α (+)) for 2 h

KB cells were treated with M-β-CyDs (10 mM) for 2 h. Thereafter, cells were treated with PI, then the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with DM-β-CyD.

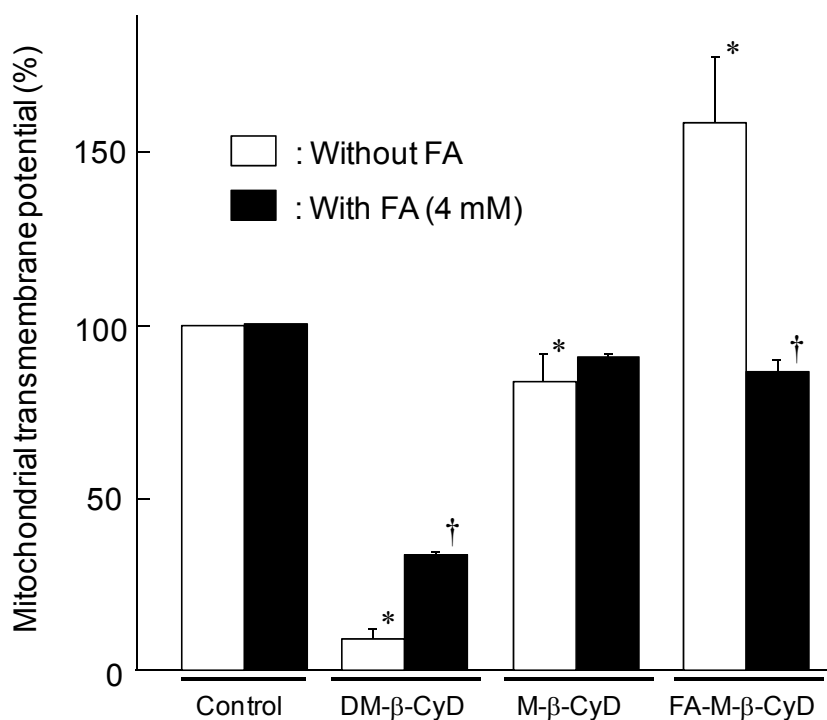


Fig. 53. Effect of FA on Mitochondrial Transmembrane Potential in KB Cells (FR-α (+)) after Treatment with M-β-CyDs for 2 h

KB cells were incubated with culture medium containing M-β-CyDs (10 mM) for 2 h. After washed with PBS, cells were stained by rhodamine 123 (10 μ M) for 15 min at 37°C. After washing once with 1 mL of PBS to remove the samples, cells were resuspended by the addition of 1 mL of PBS. Then mitochondrial transmembrane potential was analyzed by a flow cytometer. The concentration of FA was 4 mM. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$ compared with KB cells without treatment of FA.

第 6 項 カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項での検討に引き続き、本項ではアポトーシス実行因子であるカスパーゼ-3/7 活性に及ぼす M- β -CyDs の影響を調べた。なお、本項ではカスパーゼ-3/7 の活性化により生じるアミノルシフェリンの蛍光を指標に、アポトーシス誘導能を蛍光顕微鏡にて観察した。

Fig. 54 に示すように、DM- β -CyD 添加によりカスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光強度の増加が観察された。一方、M- β -CyD および FA-M- β -CyD 添加による蛍光強度の増加は認められなかった。これらの結果より、DM- β -CyD はアポトーシスを惹起するのに対し、FA-M- β -CyD はアポトーシス非依存的経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。また、本実験条件下、M- β -CyD は細胞死を誘導しないことが示唆された。

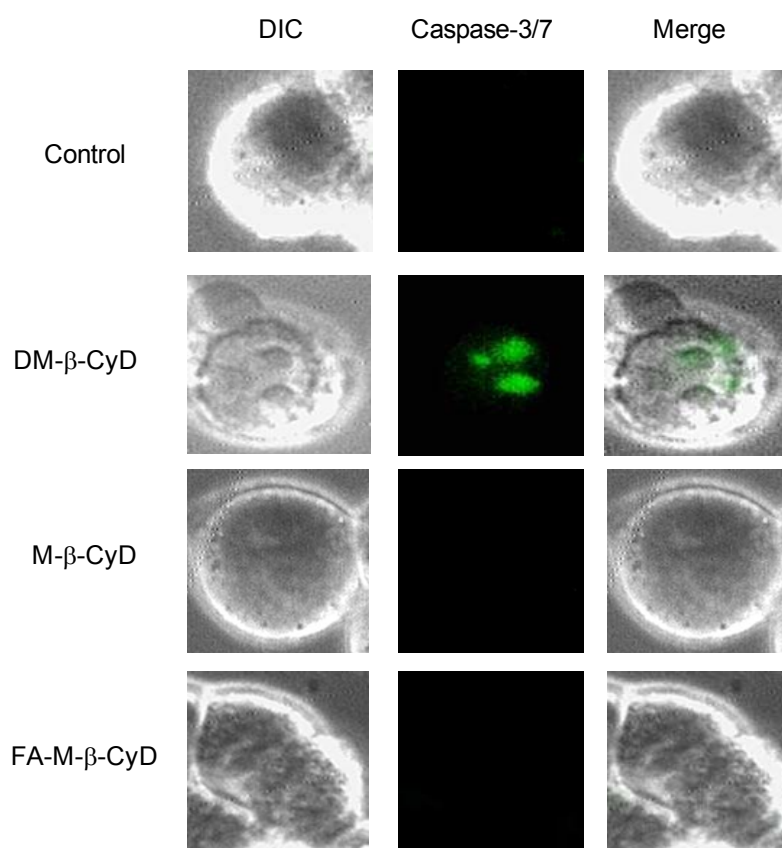


Fig. 54. Effects of M- β -CyDs on Caspase-3/7 Activity in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 2 h

KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h, and then the cells were treated with caspase-3/7 detection kit. After washed twice with culture medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 7 項 オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項での検討より、FA-M- β -CyD はアポトーシス非依存的経路により抗腫瘍活性を誘導することが明らかとなった。そこで本項では、オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。なお、オートファゴソームは、マーカー分子である LC3-II^{102, 103)} を Cyto-ID[®] を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

Fig. 55 に示すように、M- β -CyD は適用後 2 時間で LC3-II 由来の蛍光は観察されなかった。一方、FA-M- β -CyD では、LC3-II 由来の蛍光が顕著に増大した。さらに、オートファジー阻害剤である LY294002 の添加により、LC3-II 由来の蛍光は著しく減弱した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は、オートファジーを誘導することが示唆された。

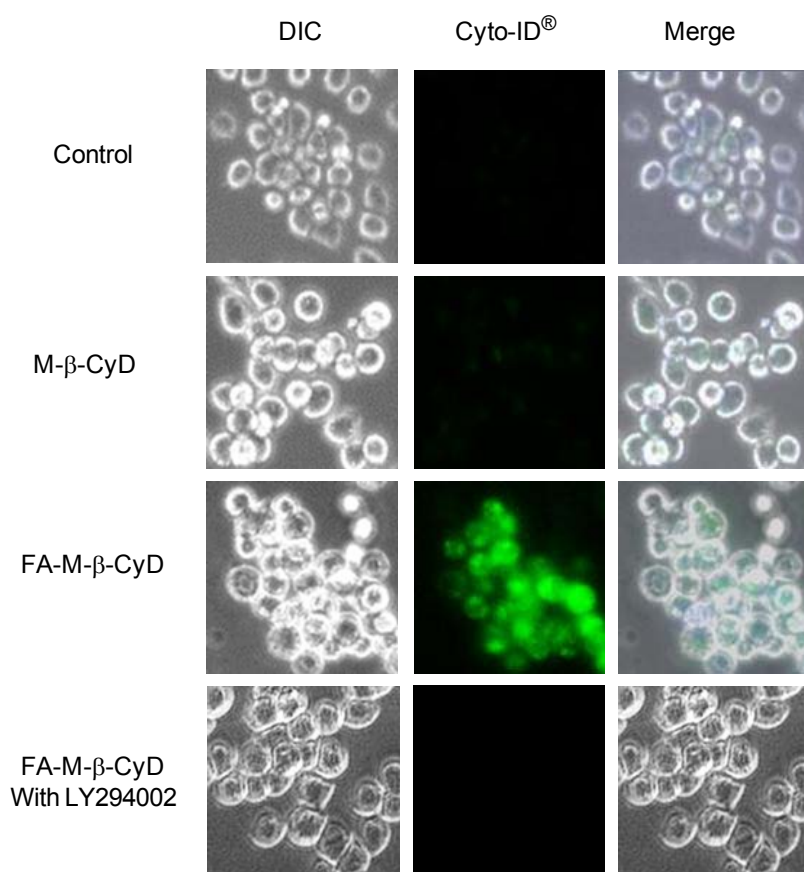


Fig. 55. Effects of M- β -CyD and FA-M- β -CyD on Autophagosome Formation in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were treated with M- β -CyDs (10 mM) for 2 h, and then the cells were treated with Cyto-ID[®]. After washed twice with culture medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 8 項 FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすオートファジー阻害剤添加の影響

前項において、FA-M- β -CyD はオートファゴソームの形成を誘導することが示唆された。そこで本項では、FA-M- β -CyD により誘導される抗腫瘍活性がオートファジーであるか否かを検討した。今回、オートファジー阻害剤には、バフィロマイシン A₁ およびクロロキンを用いた。¹⁰⁴⁾ バフィロマイシン A₁ は、マクロライド系抗生物質の一つであり、V-ATPase を持つリソソームやエンドソームの内部酸性化を阻害する。その結果、オートファゴソームとリソソーム/エンドソームとの融合が阻害され、細胞質にオートファゴソームが蓄積し、オートリソソームが減少する。¹⁰⁵⁾ 一方、クロロキンは、V-ATPase 活性非依存的にリソソームの pH を上昇させ、オートファゴソームとの融合を阻害する。

Fig. 56 は、バフィロマイシン A₁ およびクロロキンを前処理後、FA-M- β -CyD (5 mM) を 2 時間処理後の抗腫瘍活性を示す。FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、バフィロマイシン A₁ およびクロロキン添加により低下した。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性はオートファジーを介することが示唆された。

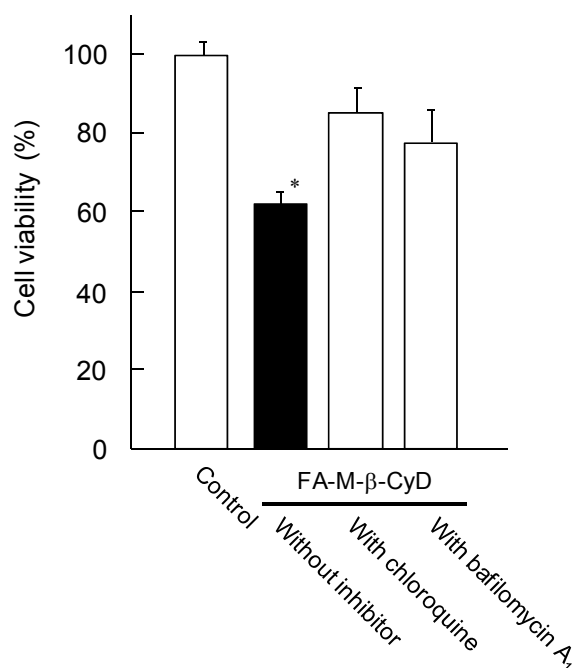


Fig. 56. Effects of Chloroquine and Bafilomycin A₁ on Antitumor Activity of FA-M- β -CyD in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment for 2 h

KB cells were incubated with chloroquine (20 μ M) or bafilomycin A₁ (1 nM) at 37°C for 24 h, and then further incubated with medium containing FA-M- β -CyD (5 mM) at 37°C for 2 h. Each value represents the mean \pm S.E. of 6-9 experiments. * p < 0.05, compared with control.

第 9 項 FA-M- β -CyD 処理後のオートファゴソームとミトコンドリアとの共局在

前項までの検討において、FA-M- β -CyD は、オートファジーを介した抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。さらに、FA-M- β -CyD はミトコンドリア膜電位を著しく上昇させたことから、ミトコンドリアにストレスを与え、マイトファジーを誘導した可能性が考えられる。そこで本項では、各種 FR- α 高発現細胞を用いて、FA-M- β -CyD のマイトファジー誘導能について検討した。実験は、LC3-II を蛍光ラベル化し、さらにローダミン 123 にてミトコンドリア膜を染色後、蛍光顕微鏡にてオートファゴソームとミトコンドリアとの共局在を観察した。

Fig. 57 は、KB 細胞を各種 M- β -CyDs (5 mM) で処理後 2 時間における結果を示す。DM- β -CyD および M- β -CyD 処理による LC3-II の蛍光強度の増大は観察されなかった。一方、FA-M- β -CyD 処理では、LC3-II の蛍光強度の有意な上昇が観察された。さらに、LC3-II とローダミン 123 の蛍光が一部共局在したことから、オートファゴソーム内にミトコンドリアが取り込まれている可能性が示唆された。同様な結果が、Ihara 細胞および M213 細胞においても確認された。(Figs. 58, 59)

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞においてマイトファジーを誘導することが示唆された。

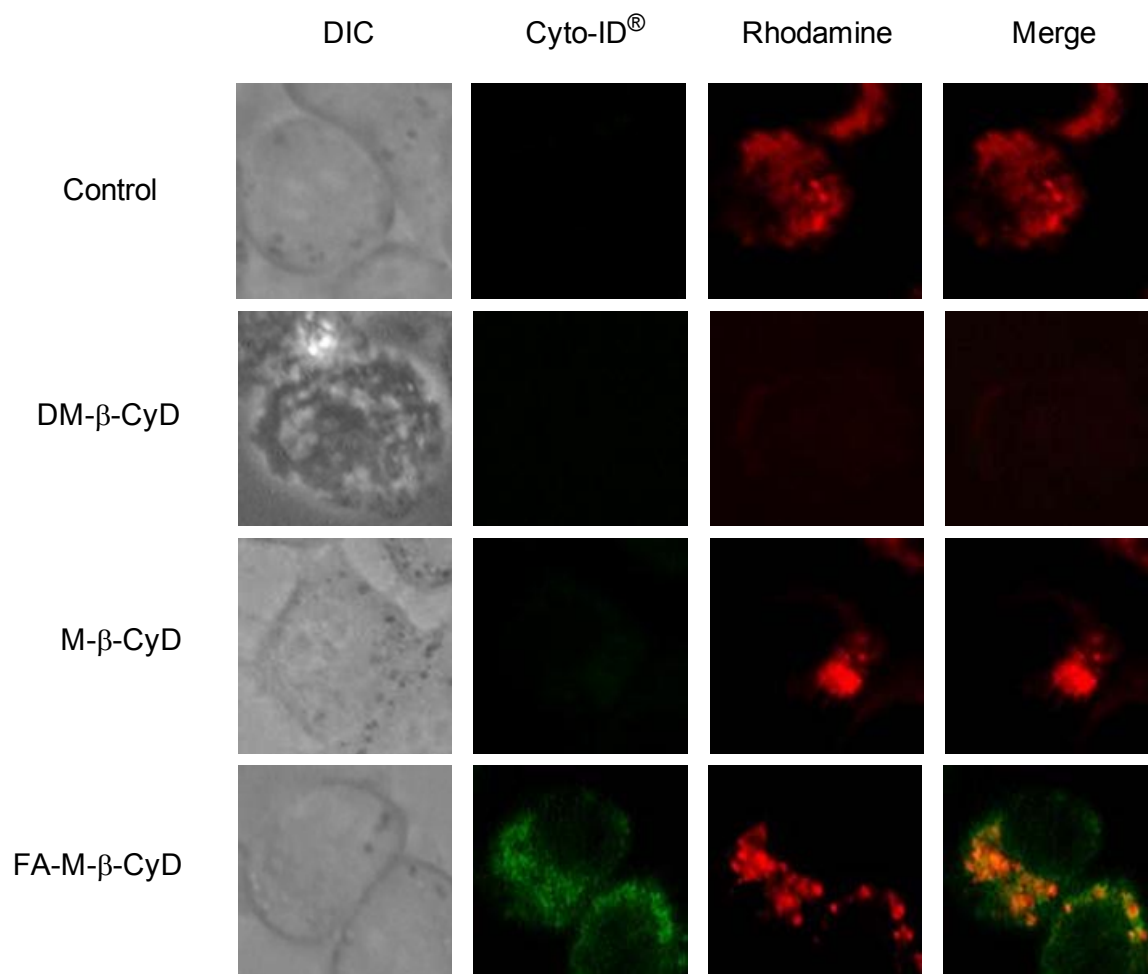


Fig. 57. Intracellular Distribution of Autophagosome and Mitochondria in KB Cells (FR- α (+)) after Treatment with M- β -CyDs for 2 h

KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h, and then the cells were treated with Cyto-ID[®] and rhodamine 123. After washed twice with culture medium (FA (+)), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

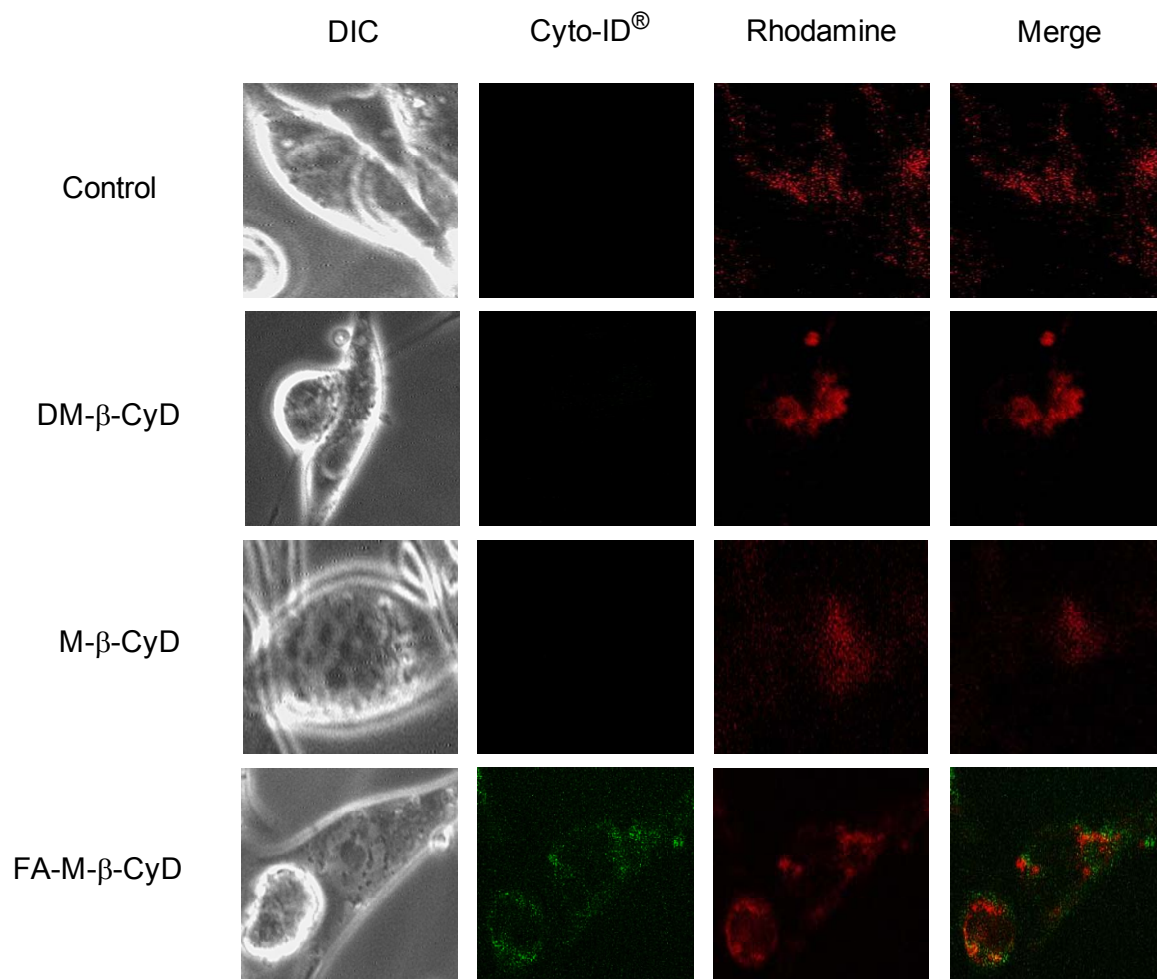


Fig. 58. Intracellular Distribution of Autophagosome and Mitochondria in Ihara Cells (FR- α (+)) after Treatment with M- β -CyDs for 2 h

Ihara cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h, and then the cells were treated with Cyto-ID[®] and rhodamine 123. After washed twice with DMEM, cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

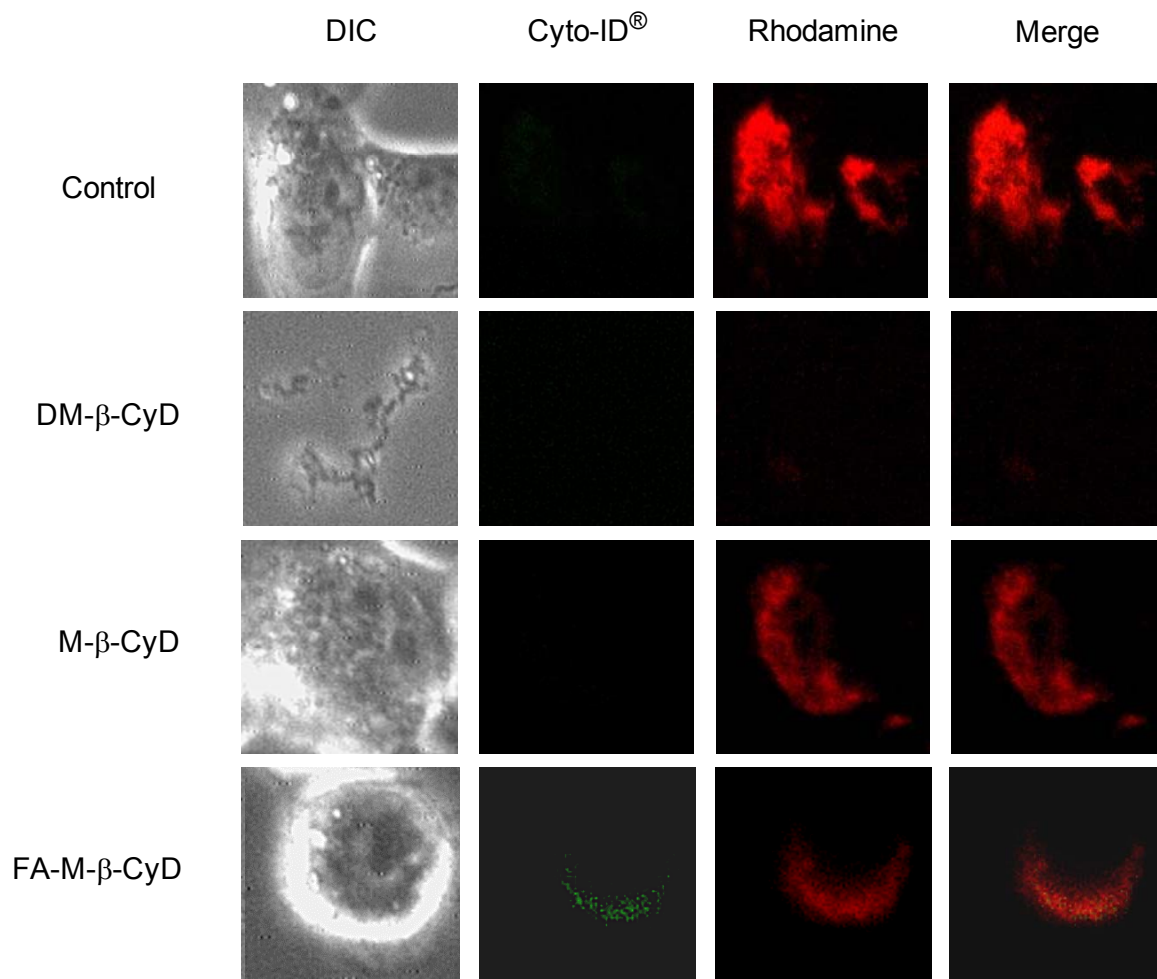


Fig. 59. Intracellular Distribution of Autophagosome and Mitochondria in M213 Cells (FR- α (+)) after Treatment with M- β -CyDs for 2 h

M213 cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h, and then the cells were treated with Cyto-ID[®] and rhodamine 123. After washed twice with DMEM, cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 4 節 FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性

前節までの検討において、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的にオートファジーを介した抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。そこで本節では、FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) および M213 細胞 (FR- α (+)) を用いて作成した担がんマウスに FA-M- β -CyD を腫瘍内および尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積、体重および生存率について検討した。なお、M213 細胞を皮下移植した BALB/c Rag-2/Jak3 ノックアウトマウスは、岡田らによって確立された B 細胞、T 細胞、NK 細胞が完全に欠損した高度免疫不全マウスである。¹⁰⁶⁾

Fig. 60 は、Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウス腫瘍内投与後の腫瘍体積および体重変化を示す。コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群は顕著に腫瘍の成長を抑制した。(Fig. 60A) また、コントロール群の体重は、腫瘍体積の増大に伴い顕著に増加した。一方、FA-M- β -CyD 投与群では、腫瘍体積の有意な減少により体重増加は緩やかであった。(Fig. 60B)

Fig. 61A は、同担がんマウス尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群では顕著に腫瘍の成長を抑制した。さらに、投与時には約 8 mm あった腫瘍は、FA-M- β -CyD 処理後 7 日目には完全に消失した。(Fig. 61B) また、コントロール群では腫瘍体積の増加に伴い、体重の顕著な増加が認められたが、FA-M- β -CyD 投与群では、体重の増加は緩やかであった。(Fig. 61C) さらに、Fig. 60D に示すように、コントロール群では、Colon-26 細胞を移植後 70 日目までに全例死亡したのに対して、FA-M- β -CyD 投与群では、140 日目においても 100% の生存率を示した。

Fig. 62A は、M213 細胞を皮下に異種移植した担がんマウス尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群では有意に腫瘍の成長を抑制した。また、コントロール群では体重の顕著な低下が認められたが、FA-M- β -CyD 投与群では、体重の減少は緩やかであった。(Fig. 62B) さらに、Table 8 に示すように、コントロール群では、サンプル投与後 9 日で 67% の生存率であったのに対し、FA-M- β -CyD 投与群では 100% の生存率を示した。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は *in vivo* においても優れた抗腫瘍活性を有することが示唆された。

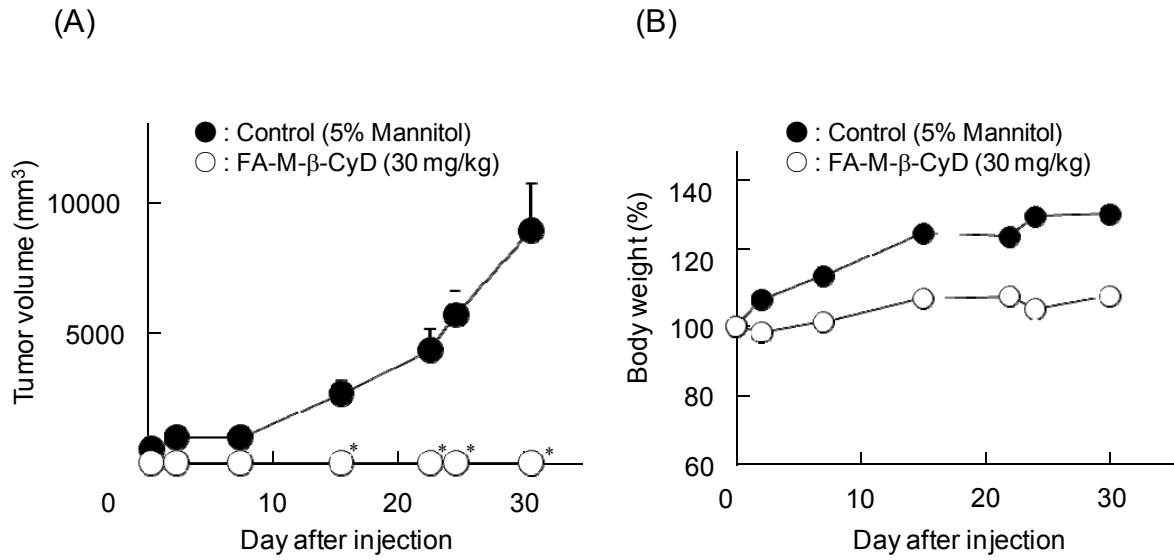


Fig. 60. Effects of Single Intratumoral Injection of FA-M-β-CyD on Tumor Volume (A) and Body Weight (B) in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

FA-M-β-CyD (30 mg/kg) was administered by a single intratumoral injection to Colon-26 cells-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E. of 3-14 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution).

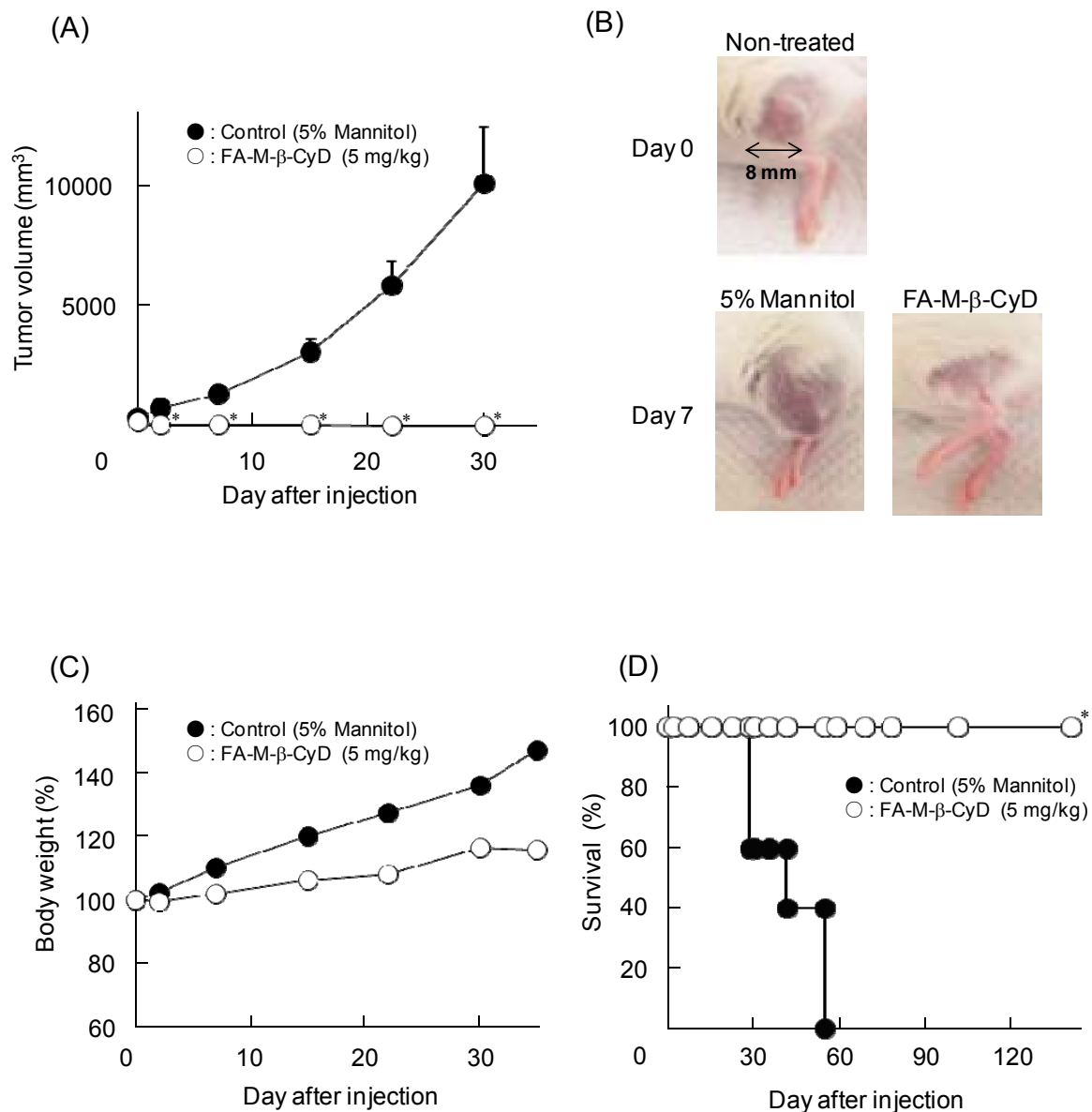


Fig. 61. Effects of Single Intravenous Injection of FA-M-β-CyD on Tumor Volume (A), Photographs of Tumor (B), Body Weight (C) and Survival Rate (D) in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

FA-M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to Colon-26 cells-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments. Each line represents the survival of 5-7 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution).

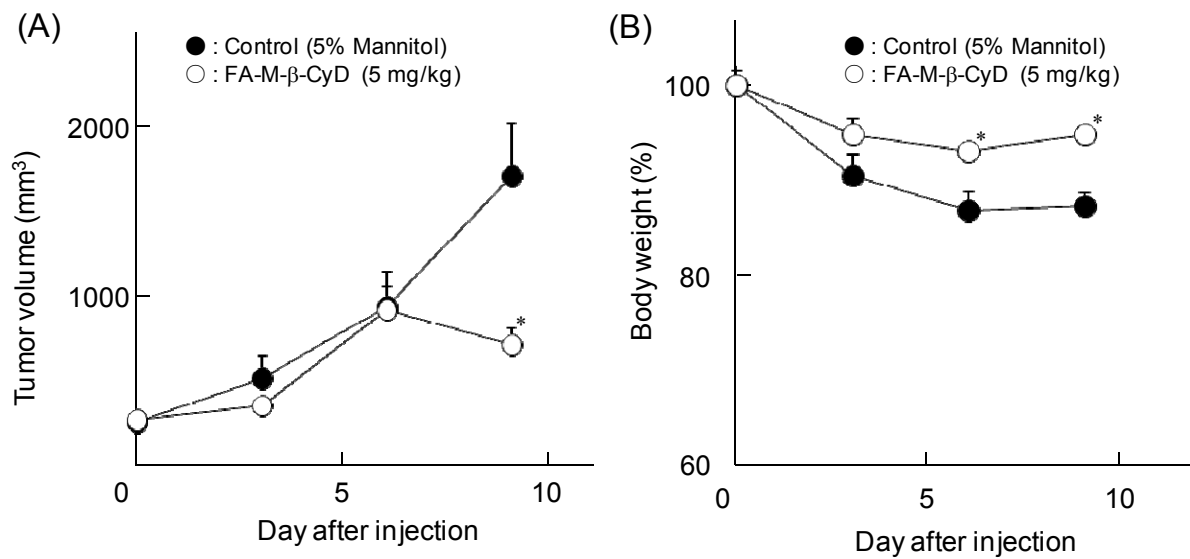


Fig. 62. Effects of Single Intravenous Injection of FA-M-β-CyD on Tumor Volume (A) and Body Weight (B) in BALB/c Rag-2/Jak3 KO Mice Bearing M213 Cells (FR-α (+))

FA-M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to M213 cells-bearing BALB/c Rag2/Jak3 KO mice. Each point represents the mean ± S.E. of 7-12 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution).

Table 8. The Number of Surviving 9 Days after Single Intravenous Injection of FA-M-β-CyD in BALB/c Rag-2/Jak3 KO Mice Bearing M213 Cells (FR-α (+))

System	Survival (number)
Control	67% (4/6)
FA-M-β-CyD (5 mg/kg)	100% (6/6)

FA-M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intravenous injection to M213 cells-bearing BALB/c Rag2/Jak3 KO mice.

第 5 節 FA-M-β-CyD 投与後の血液生化学的パラメータ

前節において、FA-M-β-CyD は *in vivo* においても優れた抗腫瘍活性を誘導することが明らかとなった。一方、抗がん剤の臨床応用を考えた場合、*in vivo* における安全性を明らかにすることは重要である。そこで本節では、FA-M-β-CyD の *in vivo* における安全性を検討するために、FA-M-β-CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスの尾静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学的パラメータを測定した。

Table 9 に示すように、FA-M-β-CyD 投与群では、いずれの生化学的パラメータにおいてもコントロール群と差異は認められなかった。これらの結果より、FA-M-β-CyD は、*in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

Table 9. Blood Chemistry Data after Single Intravenous Injection of FA-M-β-CyD in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells (FR-α (+))

System	CRE ^{a)} (mg/dL)	BUN ^{b)} (mg/dL)	AST ^{c)} (U/L)	ALT ^{d)} (U/L)	LDH ^{e)} (U/L)
Control	0.1 ± 0.00	18.5 ± 2.23	51.6 ± 4.78	17.4 ± 1.33	488 ± 25.03
FA-M-β-CyD	0.1 ± 0.02	17.0 ± 2.70	42.7 ± 7.51	22.0 ± 5.77	371 ± 32.99

FA-M-β-CyD (5 mg/kg) was administered by the single intratumoral injection to Colon-26 cells-bearing mice.

a) Creatinine, b) Blood urea nitrogen, c) Asparate aminotransferase, d) Alanine aminotransferase, e) Lactate dehydrogenase. Each value represents the mean ± S.E. of 3-10 mice.

第 6 節 考察

本章では、FA-M- β -CyD の腫瘍選択的抗がん剤としての有用性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

FR- α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD は優れた抗腫瘍活性を示したが、FR- α 低発現細胞である A549 細胞では活性を示さなかった。(Fig. 42) さらに、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FR 競合阻害剤である FA 添加および FR- α ノックダウン KB 細胞において有意に抑制された。(Figs. 45, 47) 一方、M- β -CyD は KB 細胞に対する抗腫瘍活性は低かったものの、A549 細胞に対して FA-M- β -CyD よりも有意に高い抗腫瘍活性を示した。(Fig. 42) これらの結果より、FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性は、FR- α 高発現細胞選択的であることが示唆された。実際、KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD は細胞内に取り込まれたが、A549 細胞にはほとんど取り込まれなかった。(Figs. 49, 51) さらに、FR- α ノックダウン KB 細胞においても FA-M- β -CyD の取り込みが抑制された。(Fig. 49) これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に、FR- α を介した細胞選択的な取り込みの関与が強く示唆された。

前章の検討より、M- β -CyD は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、DNA 含量およびミトコンドリア膜電位を低下させ、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。一方、FA-M- β -CyD は FR- α の発現の有無に関わらず、DM- β -CyD および M- β -CyD よりも高いコレステロール漏出作用を示した。(Fig. 44) しかし、興味深いことに KB 細胞において FA-M- β -CyD は DNA 含量を低下させず、ミトコンドリア膜電位の顕著な上昇を誘導した。(Figs. 52, 53) さらに、FA-M- β -CyD はカスパーゼ-3/7 の活性化も誘導しなかったことから、(Fig. 54) FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性はアポトーシス非依存的経路を介することが強く示唆された。また、前述したように、FA-M- β -CyD は FR- α 低発現細胞である A549 細胞においても優れたコレステロール漏出効果を示したが、(Fig. 44) 抗腫瘍活性はほとんど認められなかった。(Fig. 42) これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に対する細胞形質膜との相互作用の寄与は低いものと考えられる。

オートファジーとは、細胞内成分が二重膜によって周囲から隔離され、リソソームと融合することによって消化される細胞内浄化機構である。オートファジーは、定常状態の細胞では軽度活性化されており、細胞構成成分を少しずつ分解することによ

り細胞の新陳代謝に貢献している。一方、細胞に何らかの刺激が加わると、これに対応するために大規模なオートファジーが誘導される。本研究において、FA-M- β -CyD は KB 細胞においてオートファゴソームを形成すること、(Fig. 55) また、オートファジー阻害剤であるクロロキンやバフィロマイシン A₁ の前処理によって、その抗腫瘍活性が著しく減弱したことから、(Fig. 56) FA-M- β -CyD はオートファジーを誘導することが強く示唆された。FA-M- β -CyD によるオートファジーの誘導は、前述したように、ミトコンドリア膜電位の上昇に示されるストレスに起因するものと推察される。近年、ミトコンドリア膜にもリピッドラフトが存在しており、ミトコンドリアの機能や細胞死を制御していることが報告された。¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾ また、Ziolkowski らはラット肝臓から回収したミトコンドリアを M- β -CyD で処理すると、リピッドラフトからコレステロールが漏出され、ミトコンドリアのエネルギー代謝や膨潤などの形態学的変化が抑制されることを明らかにした。¹¹¹⁾ さらに、ミトコンドリア外膜のリピッドラフトには、膜電位を調節する VDAC が局在しており、pore の開閉を調節してミトコンドリアと細胞質間の ATP や呼吸基質などの物質輸送を行っている。これらの報告より、細胞膜上の FR- α を介して細胞内に取り込まれた FA-M- β -CyD は、何らかの方法でエンドソームを脱出した後、ミトコンドリアのリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、そのエネルギー代謝や膜電位調節機能を破綻させ、オートファジーを誘導した可能性が考えられる。一方、M- β -CyD は細胞内にほとんど取り込まれないために、細胞形質膜からのコレステロールの漏出を介してアポトーシス誘導へと向かうが、ミトコンドリア膜とは相互作用できず、オートファジーを誘導しなかったものと推察される。

近年、ミトコンドリアはアポトーシスの制御のみならずオートファジー様細胞死誘導にも関わるということが明らかとなっている。¹¹²⁾ ミトコンドリアの品質管理としては、1) プロテアーゼによるミトコンドリア内タンパク質の分解、2) ミトコンドリアそのものの分解、3) ミトコンドリアのダイナミックな分裂と融合による不良なミトコンドリアの隔離、などが知られている。^{113,114)} なかでも、ミトコンドリアそのものを分解する経路として、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーが報告されている。¹¹³⁾ 今回、FA-M- β -CyD 処理により形成されたオートファゴソームとミトコンドリアは一部共局在したことから、(Figs. 57, 58, 59) マイトファジーの関与が示唆された。近年、Narendra らは、Parkin および PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK-1) が異常なミトコンドリア外膜に結合し、マイトファジーを誘導する

ことを報告している。¹¹⁵⁾ また、神吉らはミトコンドリア外膜タンパク質である Atg32 が、マイトファジーの基質として必須であることを明らかにしている。^{116, 117)} 今後、Parkin や PINK-1、Atg32 の発現や機能に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を詳細に検討する必要がある。

Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を同種移植した BALB/c マウスおよび M213 細胞 (FR- α (+)) を異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスに FA-M- β -CyD を静脈内に単回投与したところ、腫瘍の成長を有意に抑制し、マウスの生存率を著しく改善することが明らかとなった。(Figs. 61, 62) 本実験で使用した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスは、岡田らによって開発された、成熟 T 細胞、B リンパ球のみならず NK 細胞も欠失した高度免疫不全マウスであり、異種移植モデルマウスとして有用である。¹⁰⁶⁾ 今回、FA-M- β -CyD は同種移植した担がんマウスのみならず、ヒト由来 M213 細胞 (FR- α (+)) を異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスに対しても、優れた抗腫瘍効果を示したことから、今後、臨床試験への応用が期待される。また、*in vitro* における結果より、FA-M- β -CyD による *in vivo* 抗腫瘍活性は、FR- α を介してがん細胞に効率良く取り込まれ、細胞死を誘導したものと推察される。近年、Chauhan らは粒子径 12 nm のナノメディシンが、粒子径 125 nm のナノ粒子と比較してより腫瘍深部まで到達可能であり、がん治療において有用であることを報告している。¹¹⁸⁾ 今回、データとして示さなかったが、FA-M- β -CyD の粒子径は 10 nm 以下であることを確認していることから、FA-M- β -CyD は優れた腫瘍集積性を有するものと考えられる。安全性に関することとして、FA-M- β -CyD は静脈内投与後の血液生化学的パラメータにほとんど影響を与えず、(Table 9) また、第 1 章第 3 節でも述べたように溶血活性が低いため、局所刺激性は認められなかった。一方、第 2 章第 3 節での検討により M- β -CyD は担がんマウスに静脈内投与後、障害性を惹起することが示唆された。(Table 7) これらの結果から、FA-M- β -CyD は FA を修飾したことにより、腫瘍細胞選択性が上昇し、副作用の発現が抑制されたものと推察される。また、FA-M- β -CyD は FR- α を介して細胞内に取り込まれ細胞障害活性を示すが、血球細胞では FR- α よりも FR- β が高発現しているため、副作用をほとんど示さなかったものと考えられる。今後、*in vivo* での FA-M- β -CyD によるオートファジーおよび様々ながん腫に対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性や安全性試験に関する検討を行う必要がある。

以上、本研究で得られた知見をもとに、FA-M- β -CyD による腫瘍細胞選択的な抗腫瘍活性誘導機構の推定図を Fig. 63 に示す。FA-M- β -CyD は、1) 細胞形質膜上の

FR- α を介して CLIC/GEEC 経路により細胞内に取り込まれた後、エンドソーム (GEEC) から脱出し、2) ミトコンドリア膜のリピッドラフトに作用し、その膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、3) オートファゴソームの形成およびマイトファジーを介した優れた抗腫瘍活性を示したものと考えられる。

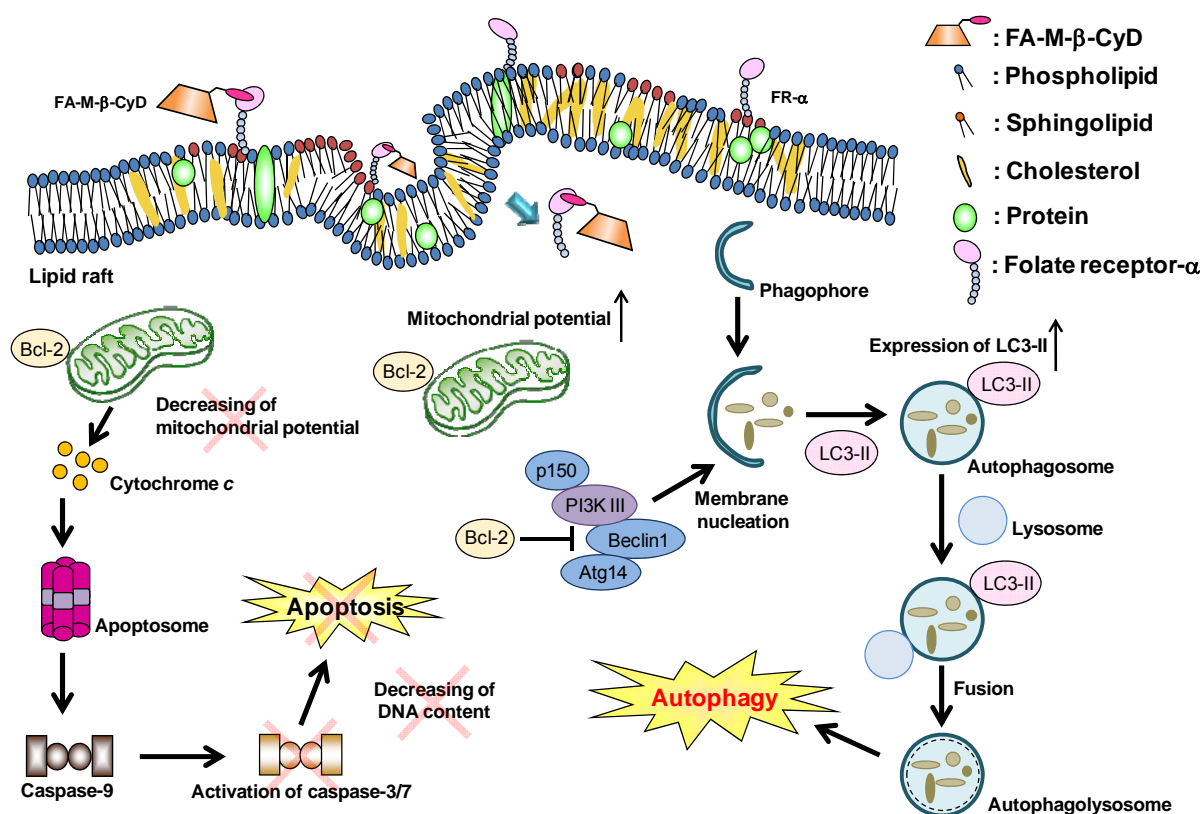


Fig. 63. Proposed Mechanism of Antitumor Activity of FA-M- β -CyD

第 7 節 小括

本章では、FA-M- β -CyD の腫瘍細胞選択的な新規抗がん剤としての有用性評価を行った。以下に本章で得られた知見を要約する。

- 1) FA-M- β -CyD は、FR- α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において優れた抗腫瘍活性を示した。一方、FR- α 低発現細胞である A549 細胞では抗腫瘍活性を示さなかった。
- 2) FA-M- β -CyD は FR- α 発現の有無に関わらず、細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを強く漏出させることが示唆された。
- 3) KB 細胞における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA の添加および FR- α のノックダウンにより有意に低下したことから、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α を介することが示された。
- 4) FA-M- β -CyD は、FR- α を介して細胞内に取り込まれることが示唆された。
- 5) KB 細胞において、FA-M- β -CyD は M- β -CyD とは対照的に、DNA 含量に影響を与えず、ミトコンドリア膜電位を顕著に上昇させ、さらに、カスパーゼ-3/7 の活性化を誘導しなかったことから、アポトーシス非依存的経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。
- 6) KB 細胞において、FA-M- β -CyD は M- β -CyD とは異なり、オートファゴソームの形成を促進した。また、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシン A₁ およびクロロキン添加により低下した。
- 7) KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD 処理により誘導されたオートファゴソームは、ミトコンドリアと一部共局在することが示唆された。

- 8) FA-M- β -CyD は、Colon-26 細胞を皮下に同種移植した BALB/c マウスにおいて、静脈内投与により腫瘍成長を顕著に抑制し、投与後 140 日目においても 100% の生存率を示した。また、FA-M- β -CyD の静脈内単回投与は、M213 細胞を皮下に異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスにおいても同様な抗腫瘍効果を示した。
- 9) FA-M- β -CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植した BALB/c マウスの尾静脈に単回投与後、血液生化学的パラメータはほとんど変化しなかったことから、FA-M- β -CyD は、*in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

以上、述べたように FA-M- β -CyD は、*in vitro* および *in vivo* において FR- α 高発現細胞選択的抗がん剤として有用であり、その抗腫瘍効果に FR- α を介したがん細胞選択的な取り込みおよびオートファジーの関与が示唆された。

総 括

本研究では、新規葉酸修飾メチル- β -CyD である FA-M- β -CyD を調製し、その抗がん剤キャリアおよび抗がん剤としての有用性を評価した。まず第 1 章では、抗がん剤キャリアとしての有用性を評価するため、抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体の *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍活性を検討した。第 2 章では、FA 非修飾体である M- β -CyD 自体の抗がん剤への応用を企図して、まず M- β -CyD の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構の解明を行った。第 3 章では、FA-M- β -CyD 自体の腫瘍選択的抗がん剤としての有用性を評価するため、*in vitro* および *in vivo* での FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構について検討した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

【第 1 章】

- 1) NH_2 -M- β -CyD と FA との脱水縮合反応により、FA-M- β -CyD を調製した。 $^1\text{H-NMR}$ および FAB MS スペクトルにより、FA-M- β -CyD は M- β -CyD と FA がモル比 1:1 で結合していることを確認した。
- 2) FA-M- β -CyD の表面張力は濃度の上昇に伴い低下したが、M- β -CyD と比較して高い値を示した。
- 3) リン酸緩衝液中において FA-M- β -CyD は DOX と極めて安定な複合体を形成し、その安定度定数は、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ という著しく高い値を示した。
- 4) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において DOX および PTX の抗腫瘍活性を増強したが、5-FU の抗腫瘍活性には影響を与えなかった。
- 5) DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、FR- α を介して DOX の細胞内取り込み量を上昇させることで、FR- α 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。

- 6) KB 細胞 (FR- α (+)) への FA-M- β -CyD の前処理および後処理は、DOX の抗腫瘍活性に影響を与えなかったことから、DOX の抗腫瘍活性増強作用には、両者の複合体形成の重要性が示唆された。
- 7) KB 細胞 (FR- α (+)) において FA-M- β -CyD は、DOX によるカスパーゼ-3/7 の活性化を促進することが示唆された。
- 8) Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスにおいて、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、静脈内投与において DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体よりも優れた抗腫瘍活性を示した。
- 9) FA-M- β -CyD は同担がんマウスにおいて、DOX の副作用を軽減することが示唆された。

【第 2 章】

- 1) Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスにおいて、M- β -CyD 自体は腫瘍内単回投与では優れた抗腫瘍活性を示したが、静脈内単回投与では十分な効果を示さなかった。また、M- β -CyD を静脈内に単回投与した場合、血液または組織に障害性を惹起させることが示唆された。
- 2) M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+)) および M213 細胞 (FR- α (+)) において優れた抗腫瘍活性を示した。
- 3) KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+)) および M213 細胞 (FR- α (+)) において、M- β -CyD はほとんど細胞内に取り込まれないことが示唆された。
- 4) KB 細胞において、M- β -CyD 処理により DNA 含量およびミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ-3/7 の活性化が観察されたことから、M- β -CyD はミトコンドリア依存的アポトーシスを誘導することが示唆された。

- 5) KB 細胞において、M- β -CyD は細胞形質膜からコレステロールを著しく漏出させた。
- 6) KB 細胞における M- β -CyD の抗腫瘍活性は、外来のコレステロールの添加により有意に抑制された。

【第 3 章】

- 1) FA-M- β -CyD は、FR- α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において優れた抗腫瘍活性を示した。一方、FR- α 低発現細胞である A549 細胞では抗腫瘍活性を示さなかった。
- 2) FA-M- β -CyD は FR- α 発現の有無に関わらず、細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを強く漏出させることが示唆された。
- 3) KB 細胞における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA の添加および FR- α のノックダウンにより有意に低下したことから、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α を介することが示された。
- 4) FA-M- β -CyD は、FR- α を介して細胞内に取り込まれることが示唆された。
- 5) KB 細胞において、FA-M- β -CyD は M- β -CyD とは対照的に、DNA 含量に影響を与えず、ミトコンドリア膜電位を顕著に上昇させ、さらに、カスパーゼ-3/7 の活性化を誘導しなかったことから、アポトーシス非依存的経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。
- 6) KB 細胞において、FA-M- β -CyD は M- β -CyD とは異なり、オートファゴソームの形成を促進した。また、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシン A₁ およびクロロキン添加により低下した。
- 7) KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD 処理により誘導

されたオートファゴソームは、ミトコンドリアと一部共局在することが示唆された。

- 8) FA-M- β -CyD は、Colon-26 細胞を皮下に同種移植した BALB/c マウスにおいて、静脈内投与により腫瘍成長を顕著に抑制し、投与後 140 日目においても 100% の生存率を示した。また、FA-M- β -CyD の静脈内単回投与は、M213 細胞を皮下に異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスにおいても同様な抗腫瘍効果を示した。
- 9) FA-M- β -CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植した BALB/c マウスの尾静脈に単回投与後、血液生化学的パラメータはほとんど変化しなかったことから、FA-M- β -CyD は、*in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

以上述べたように、FA-M- β -CyD は、FR- α を介して細胞内に取り込まれることから FR- α 高発現細胞選択的かつ安全性に優れる抗がん剤キャリアおよび抗がん剤であることが示唆された。また、FA-M- β -CyD 自体の抗腫瘍活性はオートファジーを介することが示唆された。これらの知見は、FA や M- β -CyD を用いた腫瘍細胞選択的な抗がん剤キャリアおよび抗がん剤の構築に際し、有用な基礎的資料になるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部製剤設計学分野 有馬英俊 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して懇篤なる御指導と御助言を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部製剤設計学分野 本山敬一 講師ならびに 東 大志 助教に深く感謝の意を表します。

本研究に際して有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 入江徹美 教授、熊本大学薬学部 今井輝子 教授、熊本大学大学院生命科学研究部 首藤 剛 講師に深く感謝の意を表します。

大学院進学の機会を頂き、研究の幅を広げていただいた東京工芸大学工学部 服部憲治郎 名誉教授 (現ナノデックス株式会社代表取締役) に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御協力を賜りました熊本大学エイズ学研究センター 岡田誠治 教授に深く感謝の意を表します。

本研究に御協力頂いた熊本大学エイズ学研究センター岡田プロジェクト研究室 刈谷龍昇 氏に深く感謝の意を表します。

NMR スペクトルならびに FAB MS スペクトル測定に労をとられた熊本大学機器分析センター 田中栄緒 技師官ならびに 入口利之 技師官に深く感謝致します。

β -CyD を恵与して頂きました日本食品化工株式会社に深く感謝致します。

長く厳しい研究室生活を最後まで支え、励まして頂いた 旭化成ファーマ株式会社 安野貴幸 博士、倉敷中央病院薬剤部 酒匂明日美 氏、日本たばこ産業株式会社 森 由匡 氏ならびに千寿製薬株式会社 吉松歩美 氏に深く感謝の意を表します。

私の研究生活をより有意義にしてくださいました 熊本赤十字病院薬剤部 森下絵理 氏、第一三共株式会社 田中貴弘 氏ならびに当分野 岡松文香 氏をはじめとしたでらファミリーの皆様 (赤尾千穂 氏、平位祐実 氏、光安亮輔 氏、谷吉雅俊 氏、平田宗一郎 氏、前田有紀 氏) および後輩の皆様に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御支援と御協力くださいました財団法人日本科学協会 (笹川科学研究助成金) に感謝致します。

最後に、私の長きにわたる学生生活を温かく見守り、支え御協力頂いた家族ならびに 高橋 (佐々木) 裕子 氏をはじめとする多くの友人にこの場を借りて心より感謝致します。

平成 25 年 3 月

実験の部

1. 試料、器具および溶媒等

β-CyD	日本食品化工
DM-β-CyD (DS 14)	和光純薬工業
M-β-CyD (DS 12.6)	純正化学
<i>p</i> -トルエンスルホニクロライド	ナカライテスク
水酸化ナトリウム	ナカライテスク
25% アンモニア水	和光純薬工業
2-Chloro-2,6-dimethoxy-1,3,5-triazin	関東化学
THF (no stabilizer)	和光純薬工業
<i>N</i> -Methylmorpholine	和光純薬工業
葉酸 (FA)	ナカライテスク
ジメチルスルホキシド (DMSO)	和光純薬工業
ドキシソルビシン (DOX)	メルシャン
パクリタキセル (PTX)	和光純薬工業
5-フルオロウラシル (5-FU)	和光純薬工業
スペクトラ/ポア	FED
RPMI 1640 medium (FA-free)	GIBCO
RPMI 1640 medium (FA-containing)	日水製薬
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	日水製薬
7% 炭酸水素ナトリウム注射液	大塚製薬
L-グルタミン	Sigma Chemical
HEPES	和光純薬工業
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma
注射用硫酸ストレプトマイシン (力価 : 1 g)	明治製菓
注射用ペニシリンカリウム (20 万単位)	明治製菓
Fetal bovine serum (FBS)	ニチレイ
トリプシン 250	Difco Laboratories
グルコース	ナカライテスク
Cell Counting Kit (WST-1)	同仁化学
コレステロール E-テストワコー®	和光純薬工業
Cyto-ID® Autophagy Detection Kit	Enzo Life Science
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Promega
ヨウ化プロピジウム (PI)	同仁化学
ローダミン 123	Molecular Probe
Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	フナコシ

Hoechst 33342
 LY294002
 クロロキン
 バフィロマイシン A₁
 LipofectamineTM2000 Reagent
 siGL3
 siFR-α (sc-39969)
 Agarose S
 D-マンニトール

Promega
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Invitrogen
 B-Bridge International
 Santa Cruz Biotechnology
 ニッポンジーン
 ナカライテスク

2. 動物

日本白色ウサギ
 BALB/c マウス
 BALB/c Rag-2/Jak3 ノックアウト (KO) マウス

九動
 日本 SLC
 熊本大学エイズ学研究センター 岡田プロジェクト研究室より供与

上記以外の試薬類は市販特級品を用いた。細胞培養関連実験用の溶媒としての水はミリ Q 水 (ミリ Q 超純水製造装置 (ミリポア) により製造した比抵抗値 18.3 MΩ・cm 以上の純水) を使用し、それ以外はイオン交換精製水を 2 回蒸留して用いた。また、Hanks' balanced salt solution (HBSS) および phosphate-buffered saline (PBS) は pH 7.4 のものを使用した。

3. 使用機器類

	メーカー	型式
電子天秤	IKA Works	ER-180A
pH メーター	HORIBA	F-12
減圧乾燥器	アズワン	AVO-2500N
凍結乾燥器	ヤマト科学	NEOCOOL
自動 X 線回折装置	リガク	RINT 2500
差動型示差熱天秤	リガク	TG-DTA DTA8120
マイクロプレートリーダー	Bio-Rad	Model 550
蛍光分光光度計	日立	F-4500
CO ₂ インキュベーター	ASTEC	APC-38
クリーンベンチ	日立	CCV
冷却遠心機	クボタ	1720

NMR 測定装置	日本電子	JNM- α -500
FAB MS 測定装置	日本電子	JMS-DX 303
デニューイ氏式表面/界面張力測定器	島津	NS-A574
ゲル泳動槽	コスモバイオ	Mupid-21
フローサイトメーター	Becton Dickinson	FACSCalibur™
蛍光顕微鏡	KEYENCE	Biozero BZ-9000
分光光度計	NanoDrop	ND-1000
生化学自動分析装置	日本電子	JCA-BM2250
トランスイルミネーター	FUJIFILM	Image Reader FLA-9000
走査型電子顕微鏡	日立	S-510
イオンコーター	Eiko	IB-3
振とう機	HORIBA	LA-100
蛍光マイクロプレートリーダー	TECAN	Infinite M1000

Primer 配列

Human *FR- α*

Forward primer: 5'-CATGGCTGCAGCATAGAACCTCGC-3'

Reverse primer: 5'-GTAGTAGGGGAGGCTCAGACAAGG-3'

4. 葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの調製

(1) トシル化 M- β -CyD (Ts-M- β -CyD) の調製

M- β -CyD (DS 12.2) 15 g を 0.4 M 水酸化ナトリウム 300 mL に溶解後、氷浴下、攪拌しながら *p*-トルエンスルホニルクロライド 13 g (6 当量) を加え、6 時間攪拌した。反応液ろ過後、ろ液を 1 M 塩酸で中和し、エバポレーターで濃縮した。Ts-M- β -CyD を含む濃縮液を 40°C で 3 日間減圧乾燥した。FAB MS [M]⁺ *m/z* 1488 (DST 1.2)。TLC plate: silica gel (Merck F₂₅₄); 展開溶媒: 酢酸エチル/2-プロパノール/アンモニア水/水 = 7:7:5:4 (v/v/v/v)、呈色試薬: アニスアルデヒド。

(2) アミノ化 M- β -CyD (NH₂-M- β -CyD) の調製

Ts-M- β -CyD 7 g を 25% アンモニア水 120 mL に溶解し、油浴中 40°C で 24 時間攪拌した。反応物をエバポレーターで濃縮後、NH₂-M- β -CyD を含む濃縮液を 40°C で

3 日間減圧乾燥した。FAB MS $[M]^-$ m/z 1314 (DSN 1.4)。TLC plate: silica gel (Merck F₂₅₄); 展開溶媒 : 1-ブタノール/エタノール/水 = 5 : 4 : 3 (v/v/v)、呈色試薬 : アニスアルデヒド、ニンヒドリン。

(3) 縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) の調製

2-chloro-2,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 4 g を tetrahydrofuran (THF) 60 mL に溶解後、*N*-methylmorpholine 21.7 μ L を添加し、室温で 30 分間激しく攪拌した。白色の沈殿物をろ取し、THF 30 mL で 3 回洗浄した後、室温で真空乾燥した。FAB MS $[M-Cl]^+$ m/z 241。

(4) FA 修飾 M- β -CyD (FA-M- β -CyD) の調製

NH₂-M- β -CyD 7 g、FA 14 g (6 当量)、DMSO 800 mL を添加後 40°C にて攪拌し、完全溶解させた後、室温まで冷却した。その後、メタノールに溶解した縮合剤 DMT-MM 8 g (6 当量) 100 mL を添加し、室温で 3 日間攪拌した。攪拌後、アセトン 8 L を添加し未反応の FA を析出させ、グラスフィルター (Millipore) を用いてろ過し、上清を回収した。回収液を濃縮後、0.1 M アンモニア水中で 48 時間透析 (透析膜 (スペクトラ/ポア) : MWCO = 1000) 後、H₂O 中で 24 時間透析し、溶媒を H₂O 置換した後、エバポレーターで濃縮した。濃縮液を H₂O にて再溶解後、凍結乾燥し、本品を得た。FAB MS $[M]^-$ m/z 1738 (DSF 1.0)、収率 5%。

FA-M- β -CyD : ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ from TMS) 8.64-8.61 (H7, FA), 7.55-7.51 (H13/15, FA), 6.74-6.61 (H12/16, FA), 5.11-4.85 (H1, M- β -CyD), 4.59-4.44 (H9, H19, FA) and 2.34-1.91 (H22, H21, FA). TLC plate: silica gel (Merck F₂₅₄); 展開溶媒 : 1-ブタノール/エタノール/水/25% アンモニア水 = 5 : 4 : 3 : 5 (v/v/v/v)、呈色試薬 : アニスアルデヒド、ヨウ素。

5. 物性測定

(1) NMR スペクトル: ¹H-NMR スペクトルは、NMR 測定装置にて 25°C で測定した。溶媒は D₂O を使い、各種サンプルの濃度は 1.5 mg/750 μ L とした。¹H-NMR の化学シフトは、D₂O のピークを用いて内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) からの低

磁場シフトとして表した。

(2) 粉末 X 線回折: 各種サンプル 5 mg をガラスセルに固定し、自動 X 線回折装置を用いて測定した。

(3) 示差熱分析 (DTA): 示差熱天秤を用いて測定した。校正標準物質として Al_2O_3 を用いた。試料 5 mg をアルミニウムパンに入れ、空気雰囲気下、昇温速度 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ で測定した。

(4) 表面張力: デニューイ氏式表面/界面張力測定器を用い、 β -CyDs の濃度 0.01 mM ~ 1 mM における表面張力を 25°C で測定した。

6. 溶血活性測定および形態変化観察

(1) 溶血活性: 日本白色ウサギ耳介静脈血 1.5 mL に PBS 5 mL を添加し、緩やかに混和した。1000 x g で 5 分間遠心後、上清を除去した。PBS 5 mL を添加し、同様の操作を 2 回繰り返した。得られた濃縮赤血球 0.5 mL を PBS で 10 mL にメスアップし、5% 赤血球懸濁液を調製した。PBS で調製した各濃度の β -CyDs 溶液 1 mL に 5% 赤血球懸濁液 0.1 mL を加え、 37°C 、30 分間処理し、1000 x g で 5 分間遠心後、上清を分取し、543 nm における吸光度を測定し、溶血率を算出した。

(2) 形態変化: 溶血活性の測定と同様に調製した 5% 赤血球懸濁液 0.2 mL に PBS で調製した各濃度の CyDs 溶液 2 mL を添加し、 37°C 、30 分間処理した。その後、25% グルタルアルデヒド 0.2 mL を添加して 25°C で 30 分間固定化した後、1000 x g で 5 分間遠心後、上清を分取した。蒸留水にて再懸濁した後、試料台へアプライした。 25°C で一晩乾燥させた後、イオンコーターを用いて金コーティングを施し、走査型電子顕微鏡にて観察した。

7. 各種細胞の培養

(1) KB 細胞の培養: ヒト口腔がん細胞由来の株化細胞である KB 細胞 8×10^5 個を

10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地 (L-グルタミン 300 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 2000 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞を RPMI 1640 (FA-free) 培地によりディッシュから剥離し、3000 rpm (885 x g) で 3 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

(2) A549 細胞の培養: ヒト肺上皮がん細胞由来の株化細胞である A549 細胞 8×10^5 個を 10% (v/v) FBS 含有 low-グルコース DMEM 培地 (L-グルタミン 590 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 1600 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、3000 rpm (885 x g) で 3 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 low-グルコース DMEM 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

(3) Ihara 細胞および M213 細胞の培養: ヒトメラノーマ細胞由来の株化細胞である Ihara 細胞およびヒト胆管がん細胞由来の株化細胞である M213 細胞 8×10^5 個を 10% (v/v) FBS 含有 high-グルコース DMEM 培地 (L-グルタミン 590 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 1,600 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L、グルコース 4500 mg/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、3000 rpm (885 x g) で 3 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 high-グルコース DMEM 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

8. 蛍光スペクトル法による安定度定数の算出

Scott 式 (1) に準じて、CyD 濃度に対して左辺をプロットして得られる直線の勾配と切片から安定度定数 (K_c) を求めた。

$$(a_t \cdot b_t \cdot l) / \Delta F = (1/\epsilon_c) a_t + (1/Kc \cdot \epsilon_c) \cdot \cdot \cdot \cdot (1)$$

ここで、 a_t 、 b_t は CyD およびゲスト分子の総濃度、 l はセルの長さ、 ΔF は測定波長における蛍光強度変化ならびに ϵ_c は複合体の蛍光強度に相当する定数である。

DOX (Ex : 470 nm, Em : 590 nm) の蛍光強度は、DOX 濃度 12.5 μ M、CyD 濃度を 6.25 ~ 50 μ M として、蛍光分光光度計を用いて測定した。溶媒には、リン酸緩衝液 (pH 7.8) を用い、25°C で測定した。

9. 各種抗がん剤/ β -CyDs 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性の測定

(1) DOX/ β -CyDs 複合体および 5-FU/ β -CyDs 複合体系: KB 細胞および A549 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 150 μ L で 2 回洗浄した後、10 μ M 各種サンプル (DOX、FA- β -CyD、M- β -CyD、FA-M- β -CyD、DOX/ β -CyDs および 5-FU/ β -CyDs 複合体) 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 24 時間処理した。その後、PBS 150 μ L で 2 回洗浄後、HBSS 100 μ L および WST-1 溶液 10 μ L を添加し、37°C、20 分間または 30 分間インキュベート処理後、マイクロプレートリーダーにてサンプル 450 nm、リファレンス 630 nm の吸光度を測定した。また、Tween 20 (1% (v/v)) 含有無血清培地および CyDs 非添加系の吸光度をそれぞれ生存率 0% および 100% として細胞生存率を計算した。

(2) PTX/ β -CyDs 複合体系: KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 150 μ L で 2 回洗浄した後、10 μ M の各種サンプル (PTX、FA- β -CyD、M- β -CyD、FA-M- β -CyD および PTX/ β -CyDs 複合体) 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。その後、無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄後、10% (v/v) FBS 含有培地 150 μ L を添加し 24 時間培養した。その後、DOX/ β -CyDs 複合体と同様の方法にて細胞生存率を算出した。

10. 競合阻害剤存在下の *in vitro* 抗腫瘍活性の測定

(1) DOX/ β -CyDs 複合体系: KB 細胞を 96 well plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地で 24 時間培養した。細胞を

PBS 150 μ L で 1 回洗浄後、1 mM FA を含む無血清培地 150 μ L を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を無血清培地で 1 回洗浄し、10 μ M 各種サンプル (DOX、FA- β -CyD、M- β -CyD、FA-M- β -CyD および DOX/ β -CyDs 複合体) および 1 mM FA 含有無血清培地で 24 時間処理した。その後、DOX/ β -CyDs 複合体と同様の方法にて細胞生存率を算出した。

(2) β -CyDs 単独系: KB 細胞を 96 well plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 150 μ L で 1 回洗浄後、1 mM FA を含む無血清培地 150 μ L を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を無血清培地で 1 回洗浄し、種々の濃度の β -CyDs および 1 mM FA 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、DOX/ β -CyDs 複合体と同様の方法にて細胞生存率を算出した。

11. DOX の *in vitro* 抗腫瘍活性に及ぼす β -CyDs の前処理および後処理の影響

(1) 前処理: KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 150 μ L で 2 回洗浄した後、10 μ M β -CyDs 含有無血清培地で 37°C、2 時間処理した。その後、無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄後、10 μ M DOX 含有無血清培地 150 μ L を添加し 24 時間培養した。その後、DOX/ β -CyDs 複合体と同様の方法にて細胞生存率を算出した。

(2) 後処理: KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 150 μ L で 2 回洗浄後、10 μ M DOX 含有無血清培地で 37°C、2 時間処理した。その後、無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄後、10 μ M β -CyDs 含有無血清培地 150 μ L を添加し 24 時間培養した。その後、DOX/ β -CyDs 複合体と同様の方法にて細胞生存率を算出した。

12. DOX/ β -CyDs 複合体の細胞内取り込み

KB 細胞または A549 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1×10^6 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地 1 mL

で 2 回洗浄し、10 μ M DOX または DOX/ β -CyDs 複合体含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、無血清培地 1 mL を添加し、蛍光顕微鏡にて DOX 由来の蛍光を観察後、BZ-II 解析アプリケーションを用いて定量した。

13. DOX の細胞からの排出に及ぼす M- β -CyDs の影響

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1 x 10⁶ 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。無血清培地で洗浄後、10 μ M DOX または DOX/ β -CyDs 複合体含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、無血清培地 1 mL を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間処理した。上清を回収し、さらに 1 M 水酸化ナトリウム 1 mL で細胞を溶解し、溶解液の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー (Ex : 470 nm, Em : 590 nm) により測定し、細胞から排出された DOX 量および細胞内に取り込まれた DOX 量を算出した。

14. カスパーゼ-3/7 活性の測定

(1) DOX/ β -CyDs 複合体系: KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1 x 10⁶ 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地 1 mL で 1 回洗浄し、10 μ M Hoechst 33342 を添加し、10 分間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄し、10 μ M DOX/ β -CyDs 複合体含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 12 時間または 24 時間処理した。無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、10 μ M カスパーゼ-3/7 detection reagent を添加し、37°C、30 分間処理した。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

(2) β -CyDs 単独系: KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1 x 10⁶ 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地 1 mL で 1 回洗浄し、10 μ M Hoechst 33342 を添加し、10 分間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄し、5 mM β -CyDs または 20 mM M- β -CyD 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、

終濃度が 10 μ M カスパーゼ-3/7 detection reagent を添加し、37°C、30 分間処理した。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

15. *In vivo* 実験

(1) **Colon-26 細胞皮下移植マウスの作成:** BALB/c 雄性マウス (4 週齢、20 g) の後肢に、2 日前から RPMI 1640 (FA-free) で培養した Colon-26 細胞懸濁液 (5×10^5 cells/100 μ L) を接種した。約 10 日後、マウスの腫瘍の長径が 8 mm に到達したマウスを *in vivo* 実験に用いた。なお、マウスは FA 非含有飼料により飼育した。

(2) **BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスの作成:** 岡田らのグループによって確立された方法¹⁰⁶⁾ に従い、Rag-2 欠損マウス (Rag-2^{-/-}) または Jak3 欠損マウス (Jak3^{-/-}) を BALB/c マウスを 10 世代掛け合わせることににより、それぞれ BALB/c Rag-2^{-/-} マウスおよび BALB/c Jak3^{-/-} マウスを作成した。さらに、BALB/c Rag-2^{-/-} マウスおよび BALB/c Jak3^{-/-} マウスを交配させることで、BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスを作成した。

(3) **M213 細胞皮下移植マウスの作成:** BALB/c Rag-2/Jak3 KO 雄性マウス (12 週齢、約 30 g) の脇下に high-グルコース DMEM で培養した M213 細胞懸濁液 (2×10^5 cells/200 μ L) を接種した。約 14 日後、マウスの腫瘍の長径が 10 mm に到達したマウスを *in vivo* 実験に用いた。なお、マウスは FA 含有飼料により飼育した。

(4) **Colon-26 細胞皮下移植マウスの腫瘍体積測定:** 腫瘍体積は、Corbett らの方法¹¹⁹⁾ に従い、腫瘍の長径および短径を測定し、Fig. 64 に示す計算式を用いて算出した。

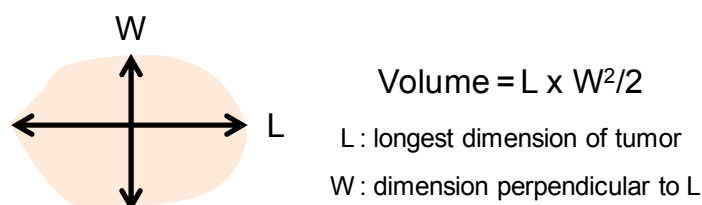


Fig. 64. Measurement of Tumor Volume in BALB/c Mice Bearing Colon-26 Cells

(5) **M213 細胞皮下移植マウスの腫瘍体積測定:** 腫瘍体積は、原田らの方法¹²⁰⁾ に従い、腫瘍の長径および短径を測定し、Fig. 65 に示す計算式を用いて算出した。

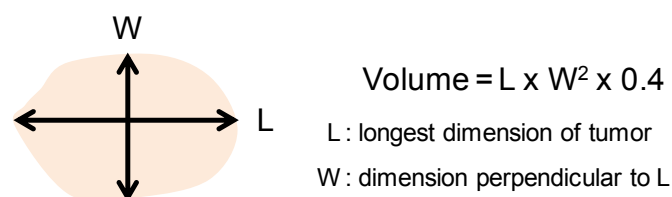


Fig. 65. Measurement of Tumor Volume in BALB/c Rag-2/Jak3 KO Mice Bearing M213 Cells

(6) **DOX/M-β-CyDs 複合体系:** DOX (5 mg/kg)、DOX/M-β-CyD (モル比 1 : 1, DOX 5 mg/kg 当量)、DOX/ FA-M-β-CyD (モル比 1 : 1, DOX 5 mg/kg 当量) を含む 5% マンニトール溶液 100 μL をマウス尾静脈内投与した。経時的に腫瘍体積、体重を測定した。なお、生存率は、投与後 140 日目をエンドポイントとしてモニタリングした。

(7) **M-β-CyDs 腫瘍内投与系:** DOX (30 mg/kg)、M-β-CyD (30 mg/kg) および FA-M-β-CyD (30 mg/kg) を含む 5% マンニトール溶液 100 μL を腫瘍内に投与した。その後、DOX/M-β-CyDs 複合体系と同様に検討した。

(8) **M-β-CyDs 静脈内投与系:** DOX (5 mg/kg)、M-β-CyD (5 mg/kg) および FA-M-β-CyD (5 mg/kg) を含む 5% マンニトール溶液 100 μL を尾静脈内投与した。その後、DOX/M-β-CyDs 複合体系と同様に検討した。

(9) **血液生化学的パラメータの算出:** 担がんマウスをエーテル麻酔下、各種サンプル (DOX、DOX/FA-M-β-CyD 複合体、M-β-CyD および FA-M-β-CyD) を含む 5% マンニトール溶液 100 μL を尾静脈より投与した。24 時間後エーテル麻酔下、腹部大動脈より採血し、血清 200 μL を分取し定量時まで凍結保存した。各種血液生化学検査値は生化学自動分析装置により定量した。

16. β-CyDs の *in vitro* 抗腫瘍活性の測定

(1) **KB 細胞および A549 細胞:** KB 細胞および A549 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。

細胞を無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄した後、種々の濃度の CyDs 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、PBS 150 μ L で 2 回洗浄後、HBSS 100 μ L および WST-1 溶液 10 μ L を添加し、37°C、20 分間または 30 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーにてサンプル 450 nm、リファレンス 630 nm の吸光度を測定した。また、Tween 20 (1% (v/v)) 含有無血清培地および CyDs 非添加系の吸光度をそれぞれ生存率 0% および 100% として CyDs の細胞生存率を計算した。

(2) Ihara 細胞および M123 細胞: Ihara 細胞および M213 細胞を 24 well culture plate に 5×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 300 μ L で 2 回洗浄した後、種々の濃度の CyDs 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、PBS 300 μ L で 2 回洗浄後、HBSS 300 μ L および WST-1 溶液 30 μ L を添加し、37°C、1 時間インキュベート後、KB 細胞および A549 細胞と同様に細胞生存率を算出した。

17. TRITC-M- β -CyDs の調製

M- β -CyDs 10 mg および TRITC 1 mg を DMSO 400 μ L に溶解し、室温、遮光下にて 24 時間反応させた。その後、H₂O 中で 72 時間透析し、凍結乾燥により TRITC-M- β -CyDs を得た。

18. FA-M- β -CyD の細胞内取り込み

(1) 蛍光分光光度計による測定: KB 細胞および A549 細胞を 35 mm tissue culture dish に 5×10^5 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、1 mM または 10 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 30 分間 または 1 時間インキュベートした。上清を除去した後、PBS で 2 回洗浄した。その後 1 M 水酸化ナトリウム 1 mL で細胞を溶解し、溶解液の蛍光強度を蛍光分光光度計 (Ex : 286 nm, Em : 350 nm) により測定し、細胞内に取り込まれた FA-M- β -CyD 量を算出した。

(2) 蛍光顕微鏡による観察: KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1×10^6 個/dish に

なるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄後、10 μ M Hoechst 33342 を添加し、10 分間インキュベーション後、無血清培地で 1 回洗浄し、10 μ M TRITC-M- β -CyDs 1 mL を添加後、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。上清を除去した後、無血清培地で 2 回洗浄した。その後、無血清培地 1 mL を添加し、蛍光顕微鏡にて観察した。

19. FR 競合阻害剤存在下での FA-M- β -CyD の細胞会合

KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1 x 10⁶ 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄した後、4 mM FA を添加し 1 時間インキュベーションした。10 μ M TRITC-FA-M- β -CyD および 4 mM FA 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を PBS 1 mL で 2 回洗浄後、0.5 mL の PBS で懸濁し、フローサイトメーターにより TRITC の蛍光強度を測定した。

20. DNA 含量の測定

KB 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1 x 10⁶ 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄後、10 mM M- β -CyDs または 20 mM M- β -CyD を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベートした。その後、細胞を全て回収し遠心分離し、PBS にて洗浄後、冷 70% EtOH (v/v) 0.5 mL で懸濁した。その後、4°C で 3 時間固定化処理を行った。遠心分離後、PBS 0.5 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベートした。さらに 200 μ g/mL RNaseA 溶液 0.5 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベートした。その後、遠心分離し、20 μ g/mL PI 溶液 0.5 mL を添加し懸濁後、氷上で 20 分間静置した。遠心分離後、0.5 mL の PBS で懸濁し、フローサイトメーターにより PI の蛍光強度を測定した。なお、遠心分離は全て 10000 rpm にて行った。

21. ミトコンドリア膜電位の測定

KB 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1 x 10⁶ 個/dish になるように播種し、10%

(v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄後、10 mM M- β -CyDs または 20 mM M- β -CyD を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベートした。細胞を全て回収し、遠心分離後、PBS 0.5 mL にて洗浄した。その後、遠心分離し 10 μ M ローダミン 123 を 0.5 mL 添加し、37°C で 15 分間静置した。遠心分離後、0.5 mL の PBS で懸濁し、フローサイトメーターによりローダミン 123 の蛍光強度を測定した。なお、遠心分離は全て 10000 rpm にて行った。

22. コレステロールの漏出

KB 細胞および A549 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1×10^6 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄し、5 mM CyDs または 20 mM M- β -CyD 含有無血清培地で 37°C、1 時間処理した。上清を遠心分離 (10000 rpm) し、上清 0.5 mL にコレステロール E-テストワコー[®] 発色試液 0.5 mL と混合して発色後、マイクロプレートリーダーにて 577 nm の吸光度を測定し、コレステロール量を算出した。

23. Cholesterol-loading M- β -CyD 溶液の調製

20 mM M- β -CyD 含有培地 5 mL にコレステロール粉末 100 mg を加え、24 時間振とうした。その溶液を遠心分離後 (3,000 rpm, 5 min)、上清をフィルター (IWAKI、Disposable Sterile Syringe Filters 25 mm, 0.20 Micron) をろ過し、Cholesterol-loading M- β -CyD 溶液を得た。

24. Cholesterol-loading M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性の測定

KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄した後、20 mM M- β -CyD および 20 mM Cholesterol-loading M- β -CyD 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、 β -CyDs の抗腫瘍活性評価と同様に細胞生存率を算出した。

25. 細胞内 mRNA の検出

(1) **Total RNA の抽出:** 細胞を PBS で 2 回洗浄後、RNeasy Mini Kit にて total RNA を抽出し、分光光度計にて 260 nm の吸光度を測定し、total RNA 量を求めた。なお、調製した RNA は OD_{260/280} 1.8 以上のものを用いた。

(2) **Reverse transcription (RT) 反応:** total RNA (3 µg) に対し、各 reverse primer (1 µM) 2 µL、5 x first strand buffer 4 µL、0.1 M DTT 2 µL、25 mM MgCl₂ 2 µL、dNTP (10 µM) 1 µL および逆転写酵素 (SuperScriptTM III RT) 1 µL を加え、PCR Thermal Cycler を用いて、42°C、2 分間インキュベーションし、続いて 42°C、50 分間 RT 反応を行いそれぞれの cDNA を得た。

(3) **Polymerase chain reaction (PCR) 反応:** Nuclease-free water 10 µL、Go Taq[®] Green Master Mix 12.5 µL、forward primer (10 µM) および reverse primer (10 µM) をそれぞれ 0.5 µL ずつ添加し、さらに RT 反応で得られた DNA template 1.5 µL を混合し、PCR Thermal Cycler を用い、95°C、11 分間プレインキュベーションし、ポリメラーゼ活性化後、94°C、1 分間の変性、55°C、1 分間のアニーリング、72°C、2 分間の DNA 伸長反応を 30 サイクル行い cDNA を増幅した。

(4) **アガロースゲル電気泳動:** PCR により増幅された DNA 10 µL を、全量を 0.5 x TBE (Tris-borate EDTA; 45 mM Tris, 45 mM ホウ酸、1 mM EDTA) で調製した 1% アガロースゲルを用いて 100 V の定圧条件下で約 30 分間泳動した。泳動終了後、アガロースゲルを EtBr (100 ng/mL) を含む TBE 溶液中で 30 分間振とうし、染色した。染色終了後、トランスイルミネーターによりゲルを撮影した。

26. トランスフェクション

KB 細胞を 24 well plate に 1×10^5 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 300 µL で 2 回洗浄後、LipofectamineTM2000/siRNA 複合体を含む無血清 RPMI 1640 培地 270 µL を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、FBS 30 µL を添加し (最終濃度; 10% (v/v))、さらに 23 時間培養した。

27. FR- α ノックダウン KB 細胞における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性の測定

前述の方法により作成した FR- α ノックダウン KB 細胞に 5 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地を 37°C、5% CO₂ 濃度下で 3 時間処理した。その後、Ihara 細胞および M213 細胞と同様に細胞生存率を算出した。

28. FR- α ノックダウン KB 細胞における FA-M- β -CyD の細胞会合

前述の方法により作成した FR- α ノックダウン KB 細胞に 10 μ M TRITC-FA-M- β -CyD 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を PBS 1 mL で 2 回洗浄後、0.5 mL の PBS で懸濁し、フローサイトメーターにより TRITC の蛍光強度を測定した。

29. FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシス阻害の影響

KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄した後、種々の濃度の FA-M- β -CyD 含有無血清培地を添加し、4°C で 2 時間処理した。その後、 β -CyDs の抗腫瘍活性評価と同様に細胞生存率を算出した。

30. オートファゴソーム形成の確認

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1×10^6 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄後、10 μ M Hoechst 33342 を添加し、10 分間インキュベーション後、無血清培地で 1 回洗浄し、10 mM M- β -CyDs を添加後、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベーションした。その後、上清を除去し無血清培地で 2 回洗浄した後、Cyto-ID[®] 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

31. オートファジー阻害剤存在下の *in vitro* 抗腫瘍活性測定

KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄した後、20 μ M クロロキンまたは 1 nM バフィロマイシン A₁ を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 24 時間インキュベーションした。その後、無血清培地で洗浄し、5 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、 β -CyDs の抗腫瘍活性評価と同様に細胞生存率を算出した。

32. オートファゴソームとミトコンドリア膜との共局在

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 1×10^6 個/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄後、10 μ M Hoechst 33342 を添加し、10 分間インキュベーション後、無血清培地で 1 回洗浄し、5 mM M- β -CyDs を添加後、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベーションした。上清を除去し無血清培地で 2 回洗浄した後、Cyto-ID[®] および 10 μ M ローダミン 123 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

参考文献

- 1) Galluzzi L., Senovilla L., Zitvogel L., Kroemer G., The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 215-233 (2012).
- 2) Jorgensen J. T., A challenging drug development process in the era of personalized medicine. *Drug Discov. Today*, **16**, 891-897 (2011).
- 3) Maruyama K., Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 161-169 (2011).
- 4) Zhu L., Kate P., Torchilin V. P., Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting. *ACS Nano*, **6**, 3491-3498 (2012).
- 5) Koo A. N., Min K. H., Lee H. J., Lee S. U., Kim K., Kwon I. C., Cho S. H., Jeong S. Y., Lee S. C., Tumor accumulation and antitumor efficacy of docetaxel-loaded core-shell-corona micelles with shell-specific redox-responsive cross-links. *Biomaterials*, **33**, 1489-1499 (2012).
- 6) Sawant R. R., Jhaveri A. M., Torchilin V. P., Immunomicelles for advancing personalized therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 1436-1446 (2012).
- 7) Salmaso S., Bersani S., Semenzato A., Caliceti P., New cyclodextrin bioconjugates for active tumour targeting. *J. Drug Target.*, **15**, 379-390 (2007).
- 8) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, **12**, 129-139 (2005).
- 9) Yoshikawa T., Niwa T., Mizuguchi H., Okada N., Nakagawa S., Engineering of highly immunogenic long-lived DC vaccines by antiapoptotic protein gene transfer to enhance cancer vaccine potency. *Gene Ther.*, **15**, 1321-1329 (2008).
- 10) O'Brien M. E., Wigler N., Inbar M., Rosso R., Grischke E., Santoro A., Catane R., Kieback D. G., Tomczak P., Ackland S. P., Orlandi F., Mellars L., Alland L., Tendler C., Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.*, **15**, 440-449 (2004).
- 11) Hamaguchi T., Matsumura Y., Suzuki M., Shimizu K., Goda R., Nakamura I., Nakatomi I., Yokoyama M., Kataoka K., Kakizoe T., NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br. J. Cancer*, **92**, 1240-1246 (2005).
- 12) Matsumura Y., Kataoka K., Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci.*, **100**, 572-579 (2009).
- 13) Davis M. E., Chen Z. G., Shin D. M., Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 771-782 (2008).
- 14) Kato K., Chin K., Yoshikawa T., Yamaguchi K., Tsuji Y., Esaki T., Sakai K., Kimura M., Hamaguchi T.,

- Shimada Y., Matsumura Y., Ikeda R., Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest. New Drugs*, **30**, 1621-1627 (2012).
- 15) Gordon A. N., Fleagle J. T., Guthrie D., Parkin D. E., Gore M. E., Lacave A. J., Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.*, **19**, 3312-3322 (2001).
 - 16) Gordon A. N., Tonda M., Sun S., Rackoff W., Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, **95**, 1-8 (2004).
 - 17) Harata M., Soda Y., Tani K., Ooi J., Takizawa T., Chen M., Bai Y., Izawa K., Kobayashi S., Tomonari A., Nagamura F., Takahashi S., Uchimarui K., Iseki T., Tsuji T., Takahashi T. A., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Maruyama K., Asano S., CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, **104**, 1442-1449 (2004).
 - 18) Roche A. C., Fajac I., Grosse S., Frison N., Rondanino C., Mayer R., Monsigny M., Glycofection: facilitated gene transfer by cationic glycopolymers. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 288-297 (2003).
 - 19) Chen H., Ahn R., Van den Bossche J., Thompson D. H., O'Halloran T. V., Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 1955-1963 (2009).
 - 20) Lu Y., Low P. S., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 675-693 (2002).
 - 21) Hatakeyama H., Akita H., Maruyama K., Suhara T., Harashima H., Factors governing the *in vivo* tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, **281**, 25-33 (2004).
 - 22) Miyajima Y., Nakamura H., Kuwata Y., Lee J. D., Masunaga S., Ono K., Maruyama K., Transferrin-loaded nido-carborane liposomes: tumor-targeting boron delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1314-1320 (2006).
 - 23) Kim I. Y., Kang Y. S., Lee D. S., Park H. J., Choi E. K., Oh Y. K., Son H. J., Kim J. S., Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release*, **140**, 55-60 (2009).
 - 24) Schiffelers R. M., Koning G. A., ten Hagen T. L., Fens M. H., Schraa A. J., Janssen A. P., Kok R. J., Molema G., Storm G., Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release*, **91**, 115-122 (2003).
 - 25) Parker N., Turk M. J., Westrick E., Lewis J. D., Low P. S., Leamon C. P., Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.*, **338**, 284-293 (2005).
 - 26) Bender M.L., Komiyama M., "Cyclodextrin Chemistry". *Springer-Verlag, Berlin*, (1978).
 - 27) Connors K. A., The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.*, **97**, 1325-1358 (1997).
 - 28) Nabi I. R., Le P. U., Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.*, **161**, 673-677 (2003).
 - 29) Uekama K., Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 900-915 (2004).

- 30) Loftsson T., Brewster M. E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 31) Rajewski R. A., Stella V. J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1142-1169 (1996).
- 32) Uekama K., Hirayama F., Irie T., Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, **98**, 2045-2076 (1998).
- 33) Uekama K., Otagiri M., Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 1-40 (1987).
- 34) Jarvinen T., Jarvinen K., Schwarting N., Stella V. J., β -cyclodextrin derivatives, SBE4- β -CD and HP- β -CD, increase the oral bioavailability of cinnarizine in beagle dogs. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 295-299 (1995).
- 35) Matsubara K., Abe K., Irie T., Uekama K., Improvement of nasal bioavailability of luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserelin, by cyclodextrin derivatives in rats. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1295-1300 (1995).
- 36) Rajewski R. A., Traiger G., Bresnahan J., Jaberaboansari P., Stella V. J., Thompson D. O., Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether β -cyclodextrin derivatives. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 927-932 (1995).
- 37) Shiotani K., Uehata K., Irie T., Uekama K., Thompson D. O., Stella V. J., Differential effects of sulfate and sulfobutyl ether of β -cyclodextrin on erythrocyte membranes *in vitro*. *Pharm. Res.*, **12**, 78-84 (1995).
- 38) Tavornvipas S., Tajiri S., Hirayama F., Arima H., Uekama K., Effects of hydrophilic cyclodextrins on aggregation of recombinant human growth hormone. *Pharm. Res.*, **21**, 2369-2376 (2004).
- 39) 服部憲治郎, シクロデキストリン誘導体の新たな機能. *薬剤学*, **68**, 398-406 (2008).
- 40) Darblade B., Caillaud D., Poirot M., Fouque M., Thiers J. C., Rami J., Bayard F., Arnal J. F., Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. *Cardiovasc. Res.*, **50**, 566-576 (2001).
- 41) Parpal S., Karlsson M., Thorn H., Stralfors P., Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9670-9678 (2001).
- 42) Chaigne-Delalande B., Mahfouf W., Daburon S., Moreau J. F., Legembre P., CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ.*, **16**, 1654-1664 (2009).
- 43) Reis-Sobreiro M., Gajate C., Mollinedo F., Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene*, **28**, 3221-3234 (2009).
- 44) Ayllon V., Fleischer A., Cayla X., Garcia A., Rebollo A., Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J. Immunol.*, **168**, 3387-3393 (2002).
- 45) Fulop T., Larbi A., Douziech N., Fortin C., Guerard K. P., Lesur O., Khalil A., Dupuis G., Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging. Cell*, **3**, 217-226 (2004).
- 46) Irie T., Otagiri M., Sunada M., Uekama K., Ohtani Y., Yamada Y., Sugiyama Y., Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes *in vitro*. *J. Pharmacobio-dyn.*, **5**, 741-744 (1982).

- 47) Yunomae K., Arima H., Hirayama F., Uekama K., Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, **536**, 225-231 (2003).
- 48) Motoyama K., Kameyama K., Onodera R., Araki N., Hirayama F., Uekama K., Arima H., Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin, not 2,6-di-*O*-methyl- α -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **38**, 249-261 (2009).
- 49) Grosse P. Y., Bressolle F., Pinguet F., Antiproliferative effect of methyl- β -cyclodextrin *in vitro* and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br. J. Cancer*, **78**, 1165-1169 (1998).
- 50) Filip Janku, David J. McConkey, Hong D. S., Kurzrock R., Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **8**, 528-539 (2011).
- 51) Cheong H., Lu C., Lindsten T., Thompson C. B., Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 671-678 (2012).
- 52) Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G., Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 741-752 (2007).
- 53) Hershko A., Ciechanover A., The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479 (1998).
- 54) Hochstrasser M., Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439 (1996).
- 55) He C., Klionsky D. J., Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 67-93 (2009).
- 56) Mizushima N., Yoshimori T., Levine B., Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, **140**, 313-326 (2010).
- 57) Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y., Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.*, **119**, 301-311 (1992).
- 58) Mizushima N., Komatsu M., Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**, 728-741 (2012).
- 59) Mizushima N., Yamamoto A., Hatano M., Kobayashi Y., Kabeya Y., Suzuki K., Tokuhisa T., Ohsumi Y., Yoshimori T., Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, **152**, 657-668 (2001).
- 60) Singh R., Kaushik S., Wang Y., Xiang Y., Novak I., Komatsu M., Tanaka K., Cuervo A. M., Czaja M. J., Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, **458**, 1131-1135 (2009).
- 61) Yan J., Li Q. F., Wang L. S., Wang H., Xiao F. J., Yang Y. F., Wu C. T., Methyl- β -cyclodextrin induces programmed cell death in chronic myeloid leukemia cells and, combined with imatinib, produces a synergistic downregulation of ERK/SPK1 signaling. *Anticancer Drugs*, **23**, 22-31 (2012).
- 62) グットマン, ギルマン, "薬理書 下" 第 8 版. 廣川書店, 東京, 1528-1529 (1992).
- 63) Hong R. L., Huang C. J., Tseng Y. L., Pang V. F., Chen S. T., Liu J. J., Chang F. H., Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin. Cancer Res.*, **5**, 3645-3652 (1999).
- 64) Liu Y., Sun J., Cao W., Yang J., Lian H., Li X., Sun Y., Wang Y., Wang S., He Z., Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.*, **421**, 160-169 (2011).

- 65) Scomparin A., Salmaso S., Bersani S., Satchi-Fainaro R., Caliceti P., Novel folated and non-folated pullulan bioconjugates for anticancer drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **42**, 547-558 (2011).
- 66) Uekama K., Novel approach of cyclodextrin-based pharmaceutical formulation. *Yakugaku Zasshi*, **132**, 85-105 (2012).
- 67) Takahashi K., Hattori K., Toda F., Monotosylated α - and β -cyclodextrins prepared in an alkaline aqueous solution. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3331-3334 (1984).
- 68) Murakami T., Harata K., Morimoto S., Synthesis and Chiral Recognition Property of 3-Acetylamino-3-deoxy- β -cyclodextrin. *Chem. Lett.*, **17**, 553-556 (1988).
- 69) Hirayama F., Mieda S., Miyamoto Y., Arima H., Uekama K., Heptakis(2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-acetyl)- β -cyclodextrin: A water-soluble cyclodextrin derivative with low hemolytic activity. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 970-975 (1999).
- 70) Sheetz M. P., Singer S. J., Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4457-4461 (1974).
- 71) Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J., Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 17-22 (1989).
- 72) Pun S. H., Davis M. E., Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 630-639 (2002).
- 73) Brewster M. E., Loftsson T., Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 645-666 (2007).
- 74) Kelemen L. E., The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int. J. Cancer*, **119**, 243-250 (2006).
- 75) Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., Boiocchi M., Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int. J. Cancer*, **74**, 193-198 (1997).
- 76) Dhar S., Liu Z., Thomale J., Dai H., Lippard S. J., Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 11467-11476 (2008).
- 77) Guaragna A., Chiaviello A., Paoletta C., D'Alonzo D., Palumbo G., Palumbo G., Synthesis and evaluation of folate-based chlorambucil delivery systems for tumor-targeted chemotherapy. *Bioconjug. Chem.*, **23**, 84-96 (2012).
- 78) Irie T., Uekama K., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 147-162 (1997).
- 79) Bakkour Y., Vermeersch G., Morcellet M., Boschini F., Martel B., Azaroual N., Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycycline-hyclate: NMR investigation of their characterisation and stability. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **54**, 109-114 (2006).
- 80) Oda Y., Kobayashi N., Yamanoi T., Katsuraya K., Takahashi K., Hattori K., Beta-cyclodextrin conjugates with glucose moieties designed as drug carriers: their syntheses, evaluations using concanavalin A and doxorubicin, and structural analyses by NMR spectroscopy. *Med. Chem.*, **4**, 244-255 (2008).
- 81) Gabizon A., Tzemach D., Gorin J., Mak L., Amitay Y., Shmeeda H., Zalipsky S., Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models. *Cancer*

- Chemother. Pharmacol.*, **66**, 43-52 (2010).
- 82) Grosse P. Y., Bressolle F., Pinguet F., *In vitro* modulation of doxorubicin and docetaxel antitumoral activity by methyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Cancer*, **34**, 168-174 (1998).
 - 83) Chiong M., Wang Z. V., Pedrozo Z., Cao D. J., Troncoso R., Ibacache M., Criollo A., Nemchenko A., Hill J. A., Lavandero S., Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis.*, **2**, e244 (2011).
 - 84) 岡松文香, 腫瘍特異的抗がん剤ナノキャリアとしての葉酸修飾シクロデキストリンの調製および有用性評価. 熊本大学修士論文, (2012).
 - 85) Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L. S., Lyu Y. L., Liu L. F., Yeh E. T., Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.*, **18**, 1639-1642 (2012).
 - 86) Kovac A. L., Sugammadex: the first selective binding reversal agent for neuromuscular block. *J. Clin. Anesth.*, **21**, 444-453 (2009).
 - 87) Yokoo M., Kubota Y., Mochinaga S., Maeda A., Ichinohe T., Fujito H., Higashi T., Motoyama K., Arima H., Irie T., Kimura S., Antiproliferative effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CyD) against chronic myeloid leukemia *in vitro* and *in vivo*. *54th ASH Annual Meeting and Exposition 要旨集*, (2012).
 - 88) Arima H., Motoyama K., Matsukawa A., Nishimoto Y., Hirayama F., Uekama K., Inhibitory effects of dimethylacetyl- β -cyclodextrin on lipopolysaccharide-induced macrophage activation and endotoxin shock in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1506-1517 (2005).
 - 89) Plazzo A. P., Hofer C. T., Jicsinszky L., Fenyvesi E., Szenté L., Schiller J., Herrmann A., Müller P., Uptake of a fluorescent methyl- β -cyclodextrin via clathrin-dependent endocytosis. *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 505-511 (2011).
 - 90) Kreuzaler P., Watson C., Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 411-424 (2012).
 - 91) Rudel T., Kepp O., Kozjak-Pavlovic V., Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 693-705 (2010).
 - 92) Wang X., The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 2922-2933 (2001).
 - 93) Kubota Y., Fukuda M., Muroguchi M., Koizumi K., Absorption, distribution and excretion of β -cyclodextrin and glucosyl- β -cyclodextrin in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1068-1072 (1996).
 - 94) Nagao G., Ishii K., Hirota K., Makino K., Terada H., Role of lipid rafts in innate immunity and phagocytosis of polystyrene latex microspheres. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **84**, 317-324 (2011).
 - 95) Kiss T., Fenyvesi F., Bacskay I., Varadi J., Fenyvesi E., Ivanyi R., Szenté L., Tosaki A., Vecsernyes M., Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **40**, 376-380 (2010).
 - 96) Rasola A., Bernardi P., Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, **50**, 222-233 (2011).
 - 97) Grimm S., Brdiczka D., The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*, **12**, 841-855 (2007).
 - 98) Arbel N., Shoshan-Barmatz V., Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity. *J. Biol. Chem.*, **285**, 6053-6062 (2012).

- 99) Roy S. S., Madesh M., Davies E., Antonsson B., Danial N., Hajnoczky G., Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca^{2+} -dependent cell survival and death. *Mol. Cell*, **33**, 377-388 (2009).
- 100) Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N., Arbel N., VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects. Med.*, **31**, 227-285 (2010).
- 101) Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 269-290 (1999).
- 102) Johansen T., Lamark T., Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, **7**, 279-296 (2011).
- 103) Kim I., Lemasters J. J., Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **300**, C308-317 (2011).
- 104) Shacka J. J., Klocke B. J., Roth K. A., Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-Cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy*, **2**, 228-230 (2006).
- 105) Yamamoto A., Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R., Tashiro Y., Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.*, **23**, 33-42 (1998).
- 106) Ono A., Hattori S., Kariya R., Iwanaga S., Taura M., Harada H., Suzu S., Okada S., Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 539748 (2011).
- 107) Garofalo T., Giammarioli A. M., Misasi R., Tinari A., Manganelli V., Gambardella L., Pavan A., Malorni W., Sorice M., Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.*, **12**, 1378-1389 (2005).
- 108) Garofalo T., Tinari A., Matarrese P., Giammarioli A. M., Manganelli V., Ciarlo L., Misasi R., Sorice M., Malorni W., Do mitochondria act as "cargo boats" in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis? *FEBS Lett.*, **581**, 3899-3903 (2007).
- 109) Malorni W., Giammarioli A. M., Garofalo T., Sorice M., Dynamics of lipid raft components during lymphocyte apoptosis: the paradigmatic role of GD3. *Apoptosis*, **12**, 941-949 (2007).
- 110) Martinez-Abundis E., Garcia N., Correa F., Franco M., Zazueta C., Changes in specific lipids regulate BAX-induced mitochondrial permeability transition. *Febs J.*, **274**, 6500-6510 (2007).
- 111) Ziolkowski W., Szkatula M., Nurczyk A., Wakabayashi T., Kaczor J. J., Olek R. A., Knap N., Antosiewicz J., Wieckowski M. R., Wozniak M., Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics. *FEBS Lett.*, **584**, 4606-4610 (2010).
- 112) Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H. U., Kimchi A., Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.*, **16**, 966-975 (2009).
- 113) Green D. R., Galluzzi L., Kroemer G., Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, **333**, 1109-1112 (2011).
- 114) Tatsuta T., Langer T., Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing.

- EMBO. J.*, **27**, 306-314 (2008).
- 115) Narendra D., Tanaka A., Suen D. F., Youle R. J., Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell. Biol.*, **183**, 795-803 (2008).
 - 116) Kanki T., Wang K., Cao Y., Baba M., Klionsky D. J., Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell.*, **17**, 98-109 (2009).
 - 117) Okamoto K., Kondo-Okamoto N., Ohsumi Y., Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell.*, **17**, 87-97 (2009).
 - 118) Chauhan V. P., Stylianopoulos T., Martin J. D., Popovic Z., Chen O., Kamoun W. S., Bawendi M. G., Fukumura D., Jain R. K., Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat. Nanotechnol.*, **7**, 383-388 (2012).
 - 119) Corbett T. H., Griswold D. P., Jr., Roberts B. J., Peckham J. C., Schabel F. M., Jr., Biology and therapeutic response of a mouse mammary adenocarcinoma (16/C) and its potential as a model for surgical adjuvant chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.*, **62**, 1471-1488 (1978).
 - 120) Harada H., Suzu S., Ito T., Okada S., Selective expansion and engraftment of human CD16⁺ NK cells in NOD/SCID mice. *Eur. J. Immunol.*, **35**, 3599-3609 (2005).